

博士論文

酵母における **non-canonical** な
翻訳伸長制御因子 **Stm1** の機能解析

林 光

目次

1. 緒言	3
1-1. 真核生物におけるタンパク質合成	3
1-1-2. 真核生物における翻訳伸長過程	4
1-2. 真核生物における翻訳伸長速度の制御	6
1-2-1. リボソーム結合シャペロンによる翻訳速度の制御機構	6
1-2-2. Non-canonical な翻訳伸長制御因子による制御機構	8
1-3. Stm1	10
1-3-1. Stm1 の同定	10
1-3-2. mRNA 分解機構における Stm1	10
1-3-3. 翻訳における Stm1	14
1-3-4. 栄養飢餓状態における Stm1	14
1-3-4-1. リボソーム貯蔵因子としての Stm1	14
1-3-4-2. TOR pathway における Stm1 の役割	15
1-3-4-3. 栄養飢餓状態でのリボファジー	15
1-3-5. Stm1 の構造	16
1-4. 目的	18
2. 実験手法	19
2-1. 出芽酵母株と生育条件	19
2-2. Stm1 欠損株(Stm1 Δ _MatA)由来の 80S リボソームの調製	19
2-3. 酵母由来 WT Stm1 と truncated Stm1 変異体の発現・精製	20
2-4. poly(U)poly(Phe)合成	21
2-5. リボソーム会合活性評価	21
2-6. Western blotting 解析	22
2-7. Single round translocation assay	22
2-8. mRNA/ribosome binding assay	24
2-9. in vitro peptide transfer assay	24
2-10. eEF2/Stm1/ribosome binding assay	25
2-11. [γ - ³² P]GTP を用いた GTPase 活性測定	25
2-12. Regenerating coupled enzyme assay	26
2-13. Cell extract の調製	26
3. 結果	27
3-1. Stm1 による翻訳抑制機構の解析	27
3-1-1. 80S リボソーム上での Stm1 の機能	27

3-1-1-1. Stm1 による翻訳抑制効果	27
3-1-1-2. Stm1 によるリボソーム会合促進活性	28
3-1-2. Stm1 の変異体解析	30
3-2. 翻訳伸長の各素過程における Stm1 の機能	32
3-2-1. Single-round translocation assay における Stm1 の効果	32
3-2-2. Stm1 存在下でのリボソームへの mRNA 結合量の比較	35
3-2-3. ペプチド転移反応における Stm1 の効果	36
3-2-4. Stm1 存在下でのリボソームへの eEF2 の結合量の比較	38
3-2-5. eEF2 の 80S リボソーム依存的な GTPase 活性への Stm1 の効果	41
4. 考察	44
4-1. Stm1 による翻訳抑制機構	44
4-1-1. Stm1 によるリボソーム上での eEF2 安定化の分子機構	44
4-1-2. Stm1 による翻訳抑制機構	47
4-1-3. Stm1 と eEF3 による翻訳伸長制御	51
4-1-4. Stm1 の C 末領域の役割	53
5. 今後の展望	54
5-1. Stm1 の生理的役割の解明	54
5-1-1. リボファジーにおける Stm1 の役割についての解析	54
5-1-2. Stm1 のユビキチン化の役割についての解析	55
5-1-3. リボファジーにおける Stm1 の役割についての考察	56
6. 総括	57
7. 参考文献	58
8. 謝辞	63

1. 緒言

1-1. 真核生物におけるタンパク質合成

リボソームは多数のタンパク質サブユニットと RNA 種からなる巨大な複合体であり、全生物に必須なタンパク合成装置としての機能を持つ。生体内におけるタンパク質合成 ("翻訳") は、開始、伸長、終結、リボソーム再生の 4 つの過程から成り (図 1)、それぞれの過程において翻訳開始因子、伸長因子、解離因子、及びリサイクル因子がリボソームと共に機能している。真核生物とバクテリアの翻訳の素過程を比較すると、開始、終結、リボソーム再生機構は、関与する因子や一連の分子機序において異なる点が多い。一方で、翻訳伸長過程では主要な伸長因子の相同性が高く、基本的なメカニズムが非常に類似している。

しかし、真核生物での翻訳伸長過程では、遺伝子発現の正確性や多様性を獲得するため、より積極的で複雑な制御機構が存在することが示唆されている。

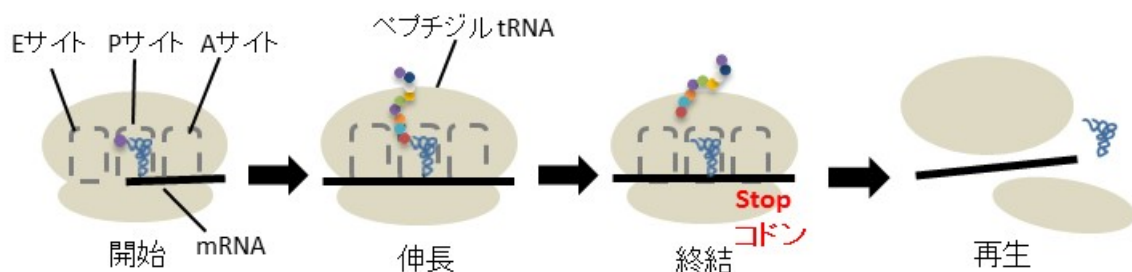


図1 タンパク質合成における4つの過程

リボソーム上で起こるタンパク質合成過程の模式図を示した。

タンパク質合成過程は4つ(開始・伸長・終結・再生)のステップに分けることができる。

1-1-2. 真核生物における翻訳伸長過程

翻訳伸長過程は、大きく分けて、①デコーディング ②ペプチド転移反応 ③トランスロケーション の3つのステップからなる。デコーディングとトランスロケーションは、翻訳伸長因子によって促進される。真核生物およびバクテリアの翻訳伸長過程に必要な伸長因子を表1に示した。

① デコーディング（遺伝暗号解読）

真核生物の伸長因子1（eukaryotic elongation factor 1：eEF1）はeEF1AとeEF1Bからなる。eEF1Aはバクテリアの伸長因子EF・Tuのホモログであり、リボソームのAサイトへアミノアシル tRNA を運ぶ役割を持つ。eEF1AもEF・Tuと同様にGTP結合能および加水分解能をもつ因子であるため、eEF1A/tRNA/GTPの三者複合体（ternary complex：TC）として機能し、リボソーム上で自らが結合するアミノアシル tRNA のアンチコドンとmRNA上のコドンが正しく対合するとGTPの加水分解反応が促進され、アミノアシル tRNA をリボソーム上に残し自らはGDPを結合した形で遊離するeEF1BはeEF1Aのグアニンヌクレオチド交換因子であり、酵母のeEF1BはeEF1B α およびeEF1B γ から成る。eEF1B α はヌクレオチド交換に必要な触媒活性を保持するドメインであり、バクテリアのEF・Tuのヌクレオチド交換因子であるEF・Tsに相当する。eEF1Bの作用によりeEF1A上に結合したGDPが解離し、再度GTP結合方の三者複合体が再生される。

② ペプチド転移反応

リボソームのAサイトでのアミノアシル tRNA のアクセプターステムのアミノアシル CCA 末端側が、Pサイトのペプチジル tRNA 末端側に peptidyl transferase center

（PTC）部位で配向する（アコモデーション）とすぐに、この部位の触媒活性によりAサイトのアミノアシル tRNA のアミノ末端にPサイトのペプチジル tRNA のペプチドのカルボキシル末端が転移するペプチド転移反応が起こる。PTCは全ての生物種で高く保存されたrRNA配列および立体構造を持つ触媒部位であり、ペプチド転移反応は、A,PサイトのtRNAのCCA末端と23S rRNAの相互作用によって促進される。

③ トランスロケーション（転座）

ペプチド転移反応の後、tRNAのアンチコドンループがP、Aサイトに留まりtRNAのアクセプターステムのみがE、Pサイトに配位する状態（hybrid state）となる。この状態からコドンの対合を保ちつつアンチコドンループ側もE、Pサイトに移行する状態

（classical state）、すなわち次のコドンがAサイトに提示され、対応するアミノアシル tRNA を受容できる元の状態に移行するためには、トランスロケーション（転座）反応が必要である。真核生物のトランスロケーションはeEF2によって促進される。GTP型の

eEF2のリボソームへは、hybrid stateのリボソームに親和性が高くこの状態を安定化させるが（pre-translocation 状態）、同時にこの結合により GTP の加水分解が誘引され GDP 型への変換が起きることで、A,P サイトの tRNA アクセプターシステムがコドン対合を維持したまま P,E サイトへと移動しつつリボソーム（pre-translocation 状態）の大小サブユニット間が回転し、classical state となる（post-translocation 状態）。最終的に、GDP 結合型の eEF2 はリボソームから解離し、E サイトのデアシル tRNA がリボソームから外れる。

このような一連の機構を繰り返すことで、翻訳伸長が進み新生鎖が合成されていく。

真核細胞	バクテリア	機能
eEF1A	EF-Tu	aa-tRNAのリボソームへのリクルート
eEF1B α	EF-Ts	GDP/GTP交換因子
eEF1B γ		
eEF2	EF-G	トランスロケーションの促進

表1 真核細胞の翻訳伸長因子とバクテリアでのホモログ
 翻訳伸長における本文中の①～③の過程において、
 真核細胞及びバクテリア間で保存される主な翻訳伸長因子の対応を示した。

1-2. 真核生物における翻訳伸長速度の制御

翻訳伸長の速度は一定ではなく、翻訳反応の速度が調節されることで減速や停止を繰り返す。翻訳の速度は、mRNA の二次構造やコドンに対応する tRNA の種類や量によっても影響を受ける。近年では新生ペプチド鎖と、PTC で合成された新生ペプチド鎖の外界への通り道であるリボソームトンネルとの相互作用が翻訳伸長速度の制御に関与することがわかってきた。さらに、リボソーマルタンパク質のユビキチン化によって翻訳速度が mRNA の配列特異的に制御される例も報告されている。以下に、リボソームに結合する翻訳制御因子やシャペロン (Cpn) の働きにより翻訳速度が制御される例について述べる。

1-2-1. リボソーム結合シャペロンによる翻訳速度の制御機構

a) Ssb/RAC

真核細胞特異的なリボソーム結合シャペロンである Ssb (Stress-Seventy subfamily B) は Hsp70 (heat shock protein 70) ファミリーに属する。Ssb はコシャペロンの RAC (ribosome associated complex) 共存下でのみ ATP 加水分解活性を示す(Huang *et al.*, 2005)。Ssb は新生鎖の合成中 (co-translational) に相互作用することで、フォールディングの難しいペプチドの凝集を防ぐと考えられている(Willmund *et al.*, 2013)。このようなシャペロンとしての働きの他に、Ssb はリジン残基が 12 個以上連続する新生ペプチド鎖配列の合成中に引き起こされる翻訳停止を解消することが示唆されている(Chiabudini *et al.*, 2012)。

真核生物において、終止コドンがアミノ酸に対応するコドンに変異した場合などや、mRNA の ORF の途中に誤って 3'末端ポリ(A)鎖 (polyA) が付加された場合などに開始コドン下流の読み枠上に終止コドンをもたない異常な mRNA (以後、nonstop mRNA) が産生される。nonstop mRNA が翻訳されると通常では翻訳されることのない ORF 下流の polyA まで翻訳が進み、C 末端側に poly リジン鎖が合成される。その結果、負に帯電したリボソームトンネル内壁と正に帯電した poly リジン鎖との電氣的相互作用により、翻訳停止が引き起こされることが考えられている(Lu *et al.*, 2008)。翻訳停止が引き起こされると mRNA の品質管理機構の一つである NSD (non-stop mRNA Decay system) により、新生鎖はプロテアーゼにより分解を受け、NSD mRNA は Ski7 依存的に分解される(Atkinson *et al.*, 2008)。Ski7 が mRNA の 3'末端に停滞したリボソームにエキソソーム (Exosome) をリクルートすることにより、3'-5'方向の mRNA 分解が促進されるモデルが提唱されている。

このような背景から Ssb は NSD において、poly(A)領域における翻訳停止を解消することにより mRNA のより 3'末端側にリボソームを移動させ、さらに Ski7 およびエキソソームをリボソームにリクルートすることにより 3'-5'方向の mRNA 分解効率を促進する可能性が示唆される。

b) NAC

NAC (Nascent polypeptide Associated Complex) は α NAC と β NAC の二つのサブユニットから構成されるヘテロ二量体のシャペロンタンパク質である。NAC はリボソーム及び新生ペプチド鎖双方と結合して機能を示すといわれ、翻訳の活性化やタンパク質恒常性に関わると考えられている(Kirstein-Miles *et al.*, 2013)。

生体内での膜蛋白質の輸送は、SRP (Signal recognition particle) と SR (SRP receptor) によって担われている。輸送の対象となるタンパク質の N 末端にはシグナルペプチドと呼ばれるシグナル配列が存在する。SRP はこのシグナル配列を認識し、SR を介して膜まで誘導することがわかっている。従来、輸送の対象となるタンパク質の翻訳が進み、シグナル配列がリボソームトンネルの外に露出した時に初めて、SRP がシグナル配列を認識してリボソームに結合できると考えられてきた。しかし、近年シグナル配列の一つである、singnal anchor (SA) と呼ばれる非常に疎水性に富んだ配列を持つ場合、SA がトンネル内にある時でも SRP がリボソームに結合できることが明らかとなった。さらに、この SRP の結合は NAC 依存的な現象であることが明らかとなった(Zhang *et al.*, 2013)。

このような背景から、NAC が膜蛋白質の翻訳速度を調節しつつ、さらに SRP をリボソームへリクルートする役割を持つことが示唆されている。

このように、翻訳伸長速度の制御が生体内での RNA およびタンパク質の品質管理機構や、タンパク質輸送システムに関与することが示唆されており、翻訳伸長速度の制御と高次生命現象は共役していることが示唆されている (図 2)。

1-2-2. Non-canonical な翻訳伸長制御因子による制御機構

真核生物では、2つの canonical な翻訳伸長因子の eEF1A と eEF2 によって、翻訳の伸長過程が進んでいる。一方で、真核細胞に特異的に存在する Stm1, eEF3, eIF5A などの翻訳制御因子は、翻訳伸長の毎サイクルに必須ではないが、配列および環境特異的な翻訳伸長の制御に関与することが明らかとなっている。そのため、non-canonical な翻訳伸長因子であると言える（図 2）。これらの non-canonical な翻訳伸長因子は、いずれも新生ペプチド鎖を介さずに翻訳伸長速度を制御する点でユニークである。本研究では、non-canonical な翻訳伸長因子の一つである Stm1 に注目した。以下に eIF5A および eEF3 について、先行研究で得られている知見の概要を述べる。

a) eIF5A

eIF5A は真核生物や古細菌に広く保存された生育に必須なタンパク質であり (Schnier *et al.*, 1991, Chen *et al.*, 1997)、バクテリア EF-P のホモログである。さらに、eIF5A は生体内でハイプシン修飾部位をもつ唯一のタンパク質であることが知られている。ハイプシン修飾は、eIF5A の特定のリジン残基（出芽酵母では K51）が 2 段階の翻訳後修飾を受けることで形成される (Park *et al.*, 2010)。ハイプシン修飾型 eIF5A は細胞増殖に必須であり、ハイプシン修飾は eIF5A のリボソーム結合能を向上させることが知られている (Jao *et al.*, 2006; Zanelli *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2016)、その生理的な役割は未だ解明されていない。

eIF5A は EF-P と同様に、連続した連続プロリン配列による翻訳停止の解消に必須であることが明らかとなった (Gutierrez *et al.*, 2013)。その後、eIF5A 依存的に翻訳が促進される配列が連続プロリン配列の他にも見出され (Schuller *et al.*, 2017; Alepuz *et al.*, 2017)、eIF5A が翻訳終結におけるペプチド解離反応も促進することが報告されている (Saini *et al.*, 2009; Schuller *et al.*, 2017)。X 線結晶構造解析および CryoEM 構造解析によって、eIF5A はリボソームの E-site に結合し、ペプチジル tRNA の CCA 末端を安定化すると示唆されている (Schmidt *et al.*, 2015; Melnikov *et al.*, 2016)。そのようにして eIF5A はリボソームのペプチジルトランスフェラーゼ活性中心における遅いペプチド転移反応を促進し、翻訳において幅広く伸長および終結過程ではたらく因子であると考えられている (Schuller *et al.*, 2017; Alepuz *et al.*, 2017)。

b) eEF3

eEF3は真菌特異的な翻訳制御因子で、poly ウリジル酸依存 poly フェニルアラニン合成 (poly(U)poly(phe)合成) に必須な第3の翻訳伸長因子として見いだされた(Skogerson *et al.*, 1976)。その後 eEF3 は、tRNA が E-site を占めている場合のみ、eEF1A 依存的な aminoacyl-tRNA の A-site 結合に必要な因子であることが明らかにされた(Triana-Alonso *et al.*, 1995)。

さらにクライオ電子顕微鏡法による構造解析から、eEF3は60SサブユニットのE-site側に結合しL1 stalkの開閉を制御することが示唆され(Andersen *et al.*, 2006)、この役割によってE-site tRNAの放出が促進され、A-site への aa-tRNA の結合が可能になることが説明できると考えられている。

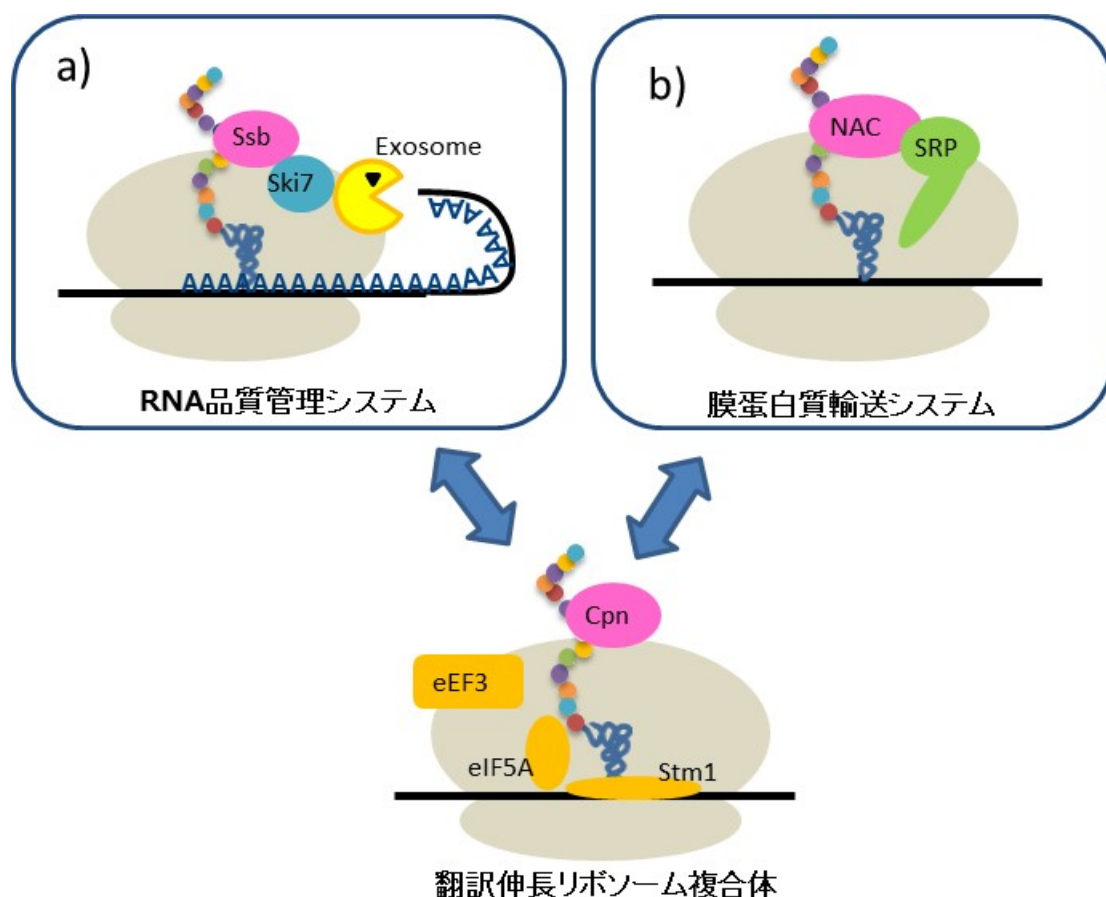


図2 翻訳伸長速度の制御

各リボソーム結合シャペロン(ピンク)、non-canonicalな翻訳伸長因子(オレンジ)及び、本文中で述べた各関連因子を示した。

- a) Ssbによる翻訳伸長速度の制御はRNAおよびタンパク質の管理機構と共認することが示唆されている。
- b) NACは翻訳伸長速度を制御し、SRP依存的なタンパク質輸送システムに関与することが示唆されている。

1-3. Stm1

Stm1 (Suppressor of TOM1) は真核細胞で広く保存された、およそ 30kDa の蛋白質である。さらに、リボソーム結合能を有することが明らかとなっている(Takaku *et al.*, 2001)。先行研究において、細胞周期制御、mRNA 分解、栄養飢餓応答など、様々な生命現象に関与することが報告されてきた。下記に Stm1 の知見の詳細を述べる。

1-3-1. Stm1 の同定

酵母 Stm1 は、元々 tom1 (trigger of mitosis) 欠損株の温度感受性サプレッサーとして同定された因子である(Utsugi *et al.*,1995)。Tom1 は細胞周期に関わる因子と考えられており、Tom1 温度感受性変異体株では、細胞周期の G2/M 期でセルサイクルが停止することで生育欠損を示すことが報告されている(Utsugi *et al.*,1995)。さらに、核からの mRNA の輸送に関与することも知られている(Utsugi *et al.*,1995)。先行研究において、Stm1 は Tom1 制御の下流で機能し、細胞周期制御に関与することが示唆されていた。ごく最近になって、Tom1 は Ribosome-bound Quality Control complex (QRC complex) の構成因子であることも報告されている(Defenouillere *et al.* 2017)。

1-3-2. mRNA 分解機構における Stm1

これまでに遺伝学的な解析から、Stm1 が mRNA 分解反応や 5'末端キャップ構造の切断反応 (デキャッピング) に関与することが示唆されている(Balagopal *et al.*, 2009)。

真核生物における mRNA の分解経路の概略図を図 3 に示した。さらに主要な因子を、表 2 に示した。真核生物の主要な mRNA 分解において、poly(A)の翻訳反応依存的な短縮化過程 (デアデニレーション反応) が第一段階であり、律速段階となる。デアデニレーション過程では、まず mRNA デアデニレースの Pan2-Pan3 複合体によって poly(A)が 110nt ほどまで分解され、続いて Ccr4-Pop2-Not 複合体によって残りの poly(A)が素早く分解される。

poly(A)が除去された後、Dcp1/2 によりデキャッピング反応が触媒される。遺伝学的および生化学的解析から、デキャッピング活性化因子が複数単離されており、間接的に促進作用を示す RNA 結合蛋白質複合体 Lsm1-7-Pat1 や RNA ヘリカーゼ Dhh1、Dcp1-Dcp2 を直接活性化する RNA 結合蛋白質 Edc1,2 などが存在する。この中でも、Pat1、Dhh1 はデアデニレーション後のデキャッピングに必須な因子であることが分かっている。

デキャッピング後は、5'→3'方向への mRNA 分解が進行する。この反応は、5'→3'エキソヌクレアーゼの XrnI によって担われている。また、3'→5'経路も補助的な分解経路として存在する。この経路は、エキソソーム-Ski 複合体によって制御されている。

このような mRNA のデキャッピングや分解に関わる因子は、P body (processing body) と呼ばれる細胞質顆粒で局在しており、P body が mRNA の分解の場になっている。

Stm1 は Dhh1 存在下での pat1Δ株の温度感受性を相補し、Dhh1 の P body への蓄積を促進するなどの先行研究から、Dhh1 の機能を促進する因子ではないかと考えられてきた。

さらに、Stm1 によって pop2Δが部分的に相補されることも明らかになっている。

先行研究において、Stm1 がリボソームに結合することで形成される stalled translation complex を Dhh1 がターゲットとし、mRNA の分解が促進されるのではないかと考えられている。つまり、リボソームへの Stm1 の結合が mRNA 分解機構の引き金になることが示唆されている。このような仮説は、Dhh1 はリボソームが stall している mRNA のみをターゲットとするという先行研究での知見とも一致する(Coller *et al.*, 2005)。

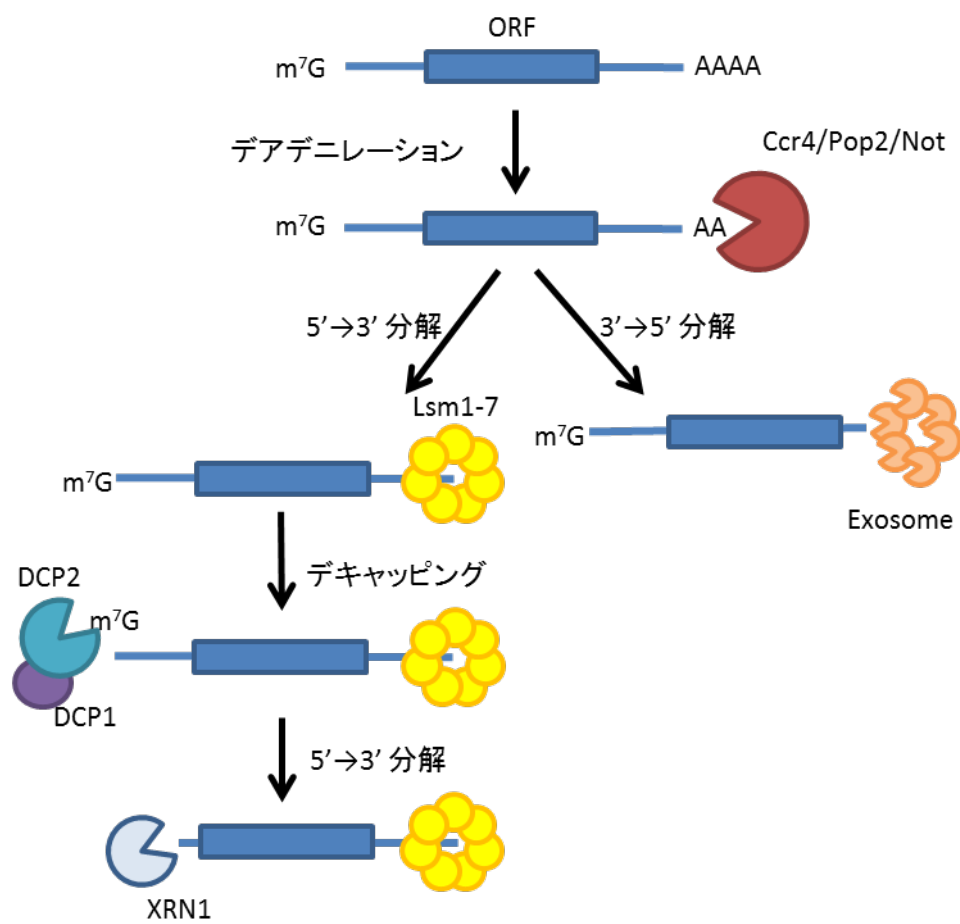


図3 デアデニレーション依存的なmRNA分解機構

Nicole L. Garneau *et al.*, (2009), *MOL BIOL CELL*より改変

	因子	機能・特徴
デアデニレーション		
CCR4-Not	Ccr4	出芽酵母での、主要なデアデニレース /Poly(A)binding protein(PABP)によって阻害さ れる
	Pop2(Caf1)	
	Caf40	
	Caf130	
	Not1	
	Not2	
	Not3	
	Not4	
	Not5	
PAN2-PAN3	PAN2 PAN3	一段階目のpoly(A)鎖の短縮化
PARN	PARN	cap依存的なデアデニレース活性を持つ
5'→3' decay		
Ecapping enzyme	DCP1	^{7me} GDPの生産
	DCP2	
Dhh1	dhh1	デキャッピングに必須
Edc proteins	Edc1,Edc2	デキャッピングを促進
	Edc3	
Lsm complex	Lsm1-7	デキャッピングに必須
Pat1	Pat1	翻訳開始を阻害し、 デキャッピング複合体をリクルート
XRN1	XRN1	エキソヌクレアーゼ

表2 出芽酵母でのmRNA分解機構の関連因子

1-3-3. 翻訳における Stm1

Stm1 はリボソーム結合能を有し(Inada *et al.*, 2002; Van Dyke *et al.*, 2004; Van Dyke *et al.*, 2006; Van Dyke *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2004; Takaku *et al.*, 2001)、翻訳の制御に関わることが示唆されている。

1-3-3-1. Stm1 と eEF3 の関係

先行研究において、Stm1 欠損株では eEF3 の発現量の増加に加え、80S に結合する eEF3 が増加することが示唆されている。一方で、Stm1 大量発現株において、80S に結合する eEF3 が減少することも示されている(Van Dyke *et al.*, 2009)。このような発現レベルの相関性から、Stm1 と eEF3 は機能的に相補関係にあることが示唆されている。

1-3-3-2. Stm1 による翻訳抑制

酵母抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系を用いて Stm1 の解析が行われ、Stm1 濃度依存的な翻訳抑制が示された(Balagopal *et al.*, 2011)。さらに Stm1 による翻訳抑制に伴い mRNA が 80S 開始複合体に蓄積することから、Stm1 は 80S 開始複合体形成過程より後の翻訳伸長過程を阻害すると主張されている(Balagopal *et al.*, 2011)。Stm1 は non-canonical な翻訳伸長制御因子のひとつと考えられる。

1-3-4. 栄養飢餓状態における Stm1

1-3-4-1. リボソーム貯蔵因子としての Stm1

栄養飢餓状態において Stm1 がリボソーム貯蔵因子としてはたらくと提唱されている。

Stm1 欠損株では、窒素源飢餓からの回復が遅れることが報告されている(Van Dyke *et al.*, 2006)。Stm1 は静止期の酵母における 80S リボソームの存在量を増大させ、ひとたび栄養源が補われると、それらの貯蓄された 80S リボソームによって効率よくタンパク質合成が再開される(Van Dyke *et al.*, 2013)。Stm1 はリボソームを安定化し、静止期においてリボソームをスクレアーゼ分解から保護していると考えられている。飢餓状態から回復する際には、Dom34-Hbs1 が Rli1 と協同的に貯蔵されたリボソームを解離することによって、タンパク質合成の開始が促進される(van den Elzen *et al.*, 2014)。

1-3-4-2. TOR pathway における Stm1 の役割

先行研究において Stm1 欠損株ではラパマイシン感受性を示すことが報告されている(Van Dyke *et al.*, 2006)。ラパマイシンは Target of rapamycin (TOR) kinase を阻害することで、栄養飢餓応答を惹起する薬剤である。通常の栄養状態では、TOR complex 1

(TORC1) はタンパク質合成やリボソームの生合成を促進し、オートファジーを阻害することが知られている。一方で、飢餓状態やラパマイシン存在下では TORC1 は阻害され、翻訳抑制やオートファジーが誘導される。

出芽酵母におけるオートファジーは細胞外環境の栄養飢餓に応じて、細胞が自身の構成成分を液胞に輸送し分解する現象である(Takeshige *et al.*, 1992)。オートファジーが誘導されると、隔離膜とよばれる脂質膜によってオルガネラや細胞質成分がとりこまれ、オートファゴソームが形成される。このオートファゴソームは液胞まで運ばれ、液胞内の加水分解酵素の作用で消化される。このようなオートファジーの機構は、飢餓時の最低限の栄養源を確保するために利用されていると考えられている。

1-3-4-3. 栄養飢餓状態でのリボファジー

さらに近年、栄養飢餓状態でのオートファジー機構の一つとして、液胞での成熟リボソームの選択的な分解機構であるリボファジーが報告されている(Kraft *et al.*, 2008, Kristensen *et al.*, 2008)。栄養飢餓状態におけるリボファジーの役割についても、過剰なタンパク合成を抑制するとともにリボソームを分解することで大量のアミノ酸等を遊離するためであると考えられている。リボファジーが誘導されると、細胞質のリボソームは液胞へと運ばれた後、液胞内で急速に分解される。さらに、リボソーマルサブユニットの 60S と 40S はそれぞれ別の経路によってリボファジーのターゲットになることが示唆されている。

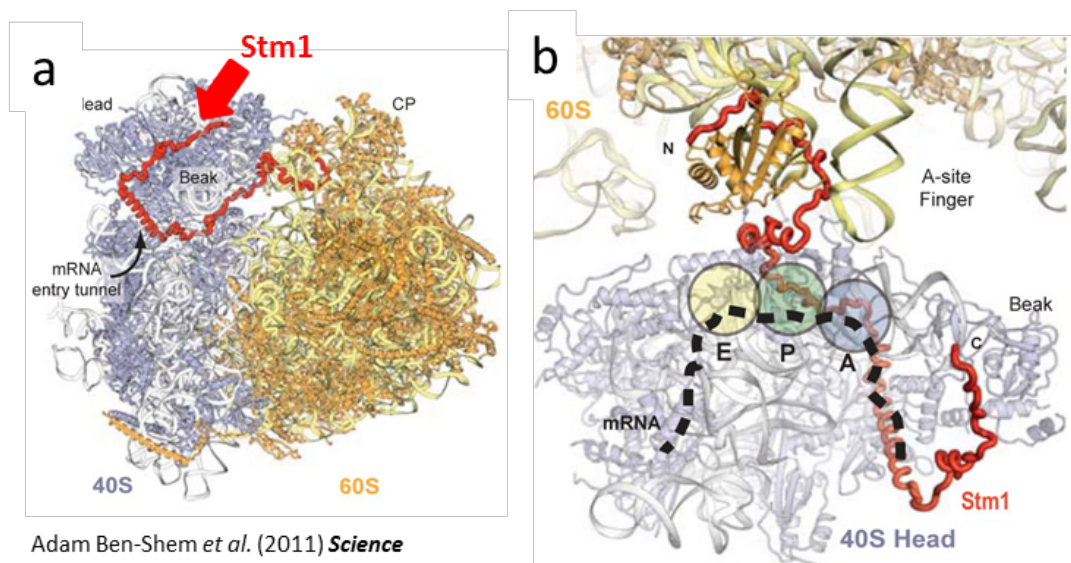
40S リボソーマルサブユニットのリボファジー経路については未だ明らかになっていないが、60S リボソーマルサブユニットの選択的な分解機構では脱ユビキチン化酵素複合体の Ubp3-Bre5 が必須であることが報告されている(O-Nazari *et al.*, 2010)。さらに最近の報告では、60S リボファジーは 60S サブユニットのリボソーマルタンパク質である Rpl25 のユビキチン化によって制御されることが明らかとなった(O-Nazari *et al.*, 2014)。E3 ligase の一つである Ltn1 による Rpl25 のユビキチン化修飾が、リボファジーの最初の分解シグナルとなる。その後、Ubp3 によって脱ユビキチン化されることで 60S サブユニットは液胞へと運ばれ分解を受ける。Ltn1 は 60S サブユニットに特異的に結合する、E3 ligase である。

1-3-5. Stm1 の構造

これまでに、Stm1 単体での構造は明らかになっていないが、結晶構造解析により 80S リボソーム上での Stm1 の構造が解かれている(Ben-Shem *et al.*, 2011) (図 4)。

Stm1 は非常にユニークなヒモ状の構造を持つタンパク質であり、この構造により 80S リボソームのサブユニット間に入り込むような構造をとる。Stm1 は 40S サブユニットの head domain に結合し、mRNA の entry tunnel、さらに A サイトおよび P サイト付近を通り、60S 側に伸びていることが明らかとなった。この時、P、A サイトでの mRNA 又は tRNA との相互作用に重要な、40S body 上の保存された残基 (C1274) と Stm1 が接触することが示された。また、Stm1 は 60S 上で helix H84 と相互作用し、5S rRNA と rprotein L5 の間を通る。さらに、Stm1 は両サブユニット合わせて 9 つの ribosomal protein と接触していることも明らかになった。近年、ヒト SERBP1 (serpine 1 mRNA-binding protein 1) の human 80S リボソーム上での構造が明らかになった(Anger *et al.*, 2013)。SERBP1 は Stm1 のホモログであり、IRES と相互作用する因子として同定されたタンパク質である。この先行研究により、SERBP1 と Stm1 の構造とリボソームへの結合様式は、非常に類似していることが示された。

以上のような構造をとることで、Stm1 は 2 つのサブユニット間を固定化することで解離を妨げ、さらには mRNA の結合を阻害することで翻訳開始複合体の形成を阻害すると予想される。この構造は Stm1 のリボソーム貯蔵因子としての機能をうまく説明できるが、Stm1 がどのようにして翻訳伸長を阻害するかについては疑問が残る。



Adam Ben-Shem *et al.* (2011) *Science*

図4 80Sリボソーム上でのStm1の構造

a) Stm1(赤)、40S(青)、60S(黄)の複合体の構造

b) 40S headと60S CPの拡大図。

Stm1はmRNAの通り道(黒点線)を通り、60S側へ伸びている

1-4. 目的

近年、翻訳伸長速度の調節が様々な細胞機能の制御に関わっていることが分かってきた。多くの **non-canonical** な翻訳伸長制御因子の解析が進めば、翻訳伸長速度を制御する機構の違いやその多様性の意義がより深く理解できるようになると期待されるが、限られた例でしか研究が進んでいない。酵母では唯一 **eIF5A** について詳細な解析が進んでおり、ペプチド転移反応を促進し、翻訳において幅広く伸長および終結過程ではたらくことが理解されている (Schuller *et al.*, 2017; Alepuz *et al.*, 2017)。

本研究では、翻訳伸長抑制に関わると報告されている **Stm1** に着目した。はじめに **Stm1** による翻訳抑制機構を解析し、**Stm1** がどのようなメカニズムで翻訳伸長制御に関わるか調べることにした。また生理的役割についても解析を試みた。

2. 実験手法

2-1. 出芽酵母株と生育条件

本研究で使用した酵母株を以下に示す。

BY4727 (MAT alpha *his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0*)

Stm1Δ_Matα (MAT alpha, *his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 stm1Δ::kanMX*)

Stm1Δ_MatA (MAT a, *his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 stm1Δ::kanMX*)

酵母株は、YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 1% dextrose) または、栄養要求性培地 (SD; 0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulphate, 2% glucose, 各アミノ酸) を用いて、30°C, 150rpm の条件で培養した。窒素源飢餓状態は、前培養で full growth まで培養した菌体を約 0.5 OD₆₀₀ になるように、栄養飢餓培地 (SD-N: 0.17% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose) に植え継ぐことで誘導した。

2-2. Stm1 欠損株(Stm1Δ_MatA)由来の 80S リボソームの調製

S. cerevisiae 由来の 80S リボソームは、先行研究に従い調製した (Leshin *et al.*, 2010)。

(1) Cystein charged Sulfolink resin (Thermo) の調製

10 mL の Sulfolink coupling gel (50% slurry) を 850 xg で 5 分間遠心 (KUBOTA 5910) し、上清を除いた。樹脂を Coupling Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 5 mM EDTA) で 3 回洗浄した。さらに樹脂に 10 mL の Cystein solution (50 mM L-cystein, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 5 mM EDTA) を加えた後、25°C で 1 時間振とうした。上清を除き、10 mL の Binding Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 60 mM NH₄Cl, 2 mM DTT) で 3 回洗浄した。上清を取り除いた後、樹脂と同量の Binding Buffer を加え、4 °C で保存した。

(2) Cystein charged Sulfolink resin を使った 80S リボソームの調製

Stm1Δ_MatA 株は、前培養として YPD 培地を用いて 30°C で一晩培養した。full growth の菌体を 1/50 希釈で 900 mL の本培養培地に植え継ぎ、30°C で OD₆₀₀=1 になるまで培養した。

培地に氷を加えて、1 Lにメスアップした後4,500 rpm, 4°Cで25分間遠心し菌体を回収した。

菌体1 gあたりを、0.5 mg/mL heparin, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail tablets (EDTA-free, Roche) を加えた1 mLのBindung Bufferで懸濁した。懸濁液を2 mLずつ破砕用チューブ (SST-5001 or ST-5010C) に移し、チューブごと液体窒素で5分間凍結させた。その後、チューブにメタルコーン (MC-5028) を入れ、Beads-shocker (YASUI KIKAI) を用いて3,000 rpm で15秒間破砕した。メタルコーンを素早く取り除き、菌体を氷上で融解させた。融解後、20 mLのBindung Bufferを加え、デブリを除くために1,000 xgで10分間遠心した。さらに上清を、30,000 xgで30分間遠心し、その上清をS30として回収した。S30はSulfolink slurryに加え、氷上で30分間インキュベートした。樹脂は1,000 xgで1分間遠心し上清を取り除いた後、Bindung Bufferで3回洗浄した。樹脂をElution Buffer (10 mM Tris-HCl(pH7.5), 10 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 2 mM DTT, 0.5 mg/mL heparin) で2回洗浄し、リボソームを含むElution Sampleを回収した。リボソームを含むElution Sampleはスクロースクッションによって、さらに精製した。Elution Sampleを70Tiチューブに入れた2.5 mLのbuffer C (50 mM Hepes(pH7.6), 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 50 mM NH₄Cl, 1mM DTT, 25% glycerol) の上に重層し、100,000 xgで16時間遠心した。ペレットを回収し、菌体1 gあたり50 µLの5/100 buffer (20 mM Hepes-KOH(pH7.4), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.25 mM EDTA, 2 mM DTT) で懸濁した。

2-3. 酵母由来 WT Stm1 と truncated Stm1 変異体の発現・精製

N末Hisタグ付きStm1 (Nhis-Stm1) およびC末Hisタグ付きStm1 (Chis-Stm1) の大腸菌発現用ベクターとして、それぞれNhis-STM1/pET15b, Chis-STM1/pET29bを用いた。Stm1をコードする配列は、出芽酵母YPH499株由来のゲノムからPCRで増幅した。

下記に使用したプライマーを示す。

Nhis-Stm1; 5'- GCATACACAT TTTATTCCATATGTCCAACC CATTTGATTTGTTAG - 3' and 5'- TCATATAGTCGACTTAAGCCAAAGATGGCAAGTTAGAA - 3'

Chis-Stm1; 5'- TCATATAGTCGACAGCCAAAGATGGCAAGTTAGAA - 3' and 5'- GCATACACAT TTTATTCCATATGTCCAACC CATTTGATTTGTTAG - 3'

増幅させたインサート配列は、等研究室で構築し制限酵素部位が増加されたpET15bベクター (pET15b-linker) およびpET29bベクター (Novagen) を用いて、制限酵素部位NdeI/SalIにクローニングした。Nhis-STM1/pET15bおよびChis-STM1/pET29bは、*E. coli* BL21(Gold)(DE3)に形質転換した。菌体はLB培地で27°C一晩培養し、full growthの菌体を1/100希釈で2×YT培地に植継いだ。37 °Cで培養し、OD600 = 0.4~0.6で、100

μ M isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside (IPTG) によって発現誘導を行った後、18°Cで一晩培養し、菌体を回収した。

タンパク質はNi-NTA (QIAGEN) カラムクロマトグラフィーで精製した。Nhis-Stm1は、スロンビンプロテアーゼ (GE healthcare) でHisタグを切除した。続いて、mono S 4.6/100 PE column chromatography (GE healthcare) による精製を行った。精製したStm1はStm1 Buffer (20 mM Hepes-KOH(pH7.5), 200 mM KCl, 50% Glycerol, 1mM DTT) で透析した。透析後に回収したサンプルを濃縮し、-80°Cで保存した。

N末端およびC末端の系統的欠失株の発現ベクターは、Nhis-STM1/pET15b, Chis-STM1/pET29bをテンプレートDNAとしてquick change法を用いて作成した。各変異体は、Nhis-Stm1およびChis-Stm1の精製方法に倣って発現・精製を行った。

2-4. poly(U)poly(Phe)合成

1 pmol Stm1 Δ 80Sリボソームと、25 pmol [14 C]Phe-tRNA^{Phe} (出芽酵母由来) を、20 mM Hepes-KOH(pH7.5), 150 mM KOAc, 2.5 mM Mg(OAc)₂, 0.05 mM spermine, 7.5 mM creatine phosphate, 1.25 μ g creatine kinase, 0.1 mM GTP, 5 μ g poly(U), 12.5 U SuperNaseIn, 1.0% (w/v) PEG6000, 2.5 pmol of eEF1A, 2.5 pmol of eEF2,存在下で30°C、30分間インキュベートした。さらに、Stm1およびStm1変異体は本文で指定されている量加えた。インキュベート後、1N NaOH 100 μ Lを加え、さらに30°C、10分間インキュベートした。10% TCAを5 mL加え、氷上に5分間静置した。 溶液をGF/Cフィルターに通過させpoly(Phe)を吸着させ、10% TCAでフィルターを3回洗浄し、次に100% エタノールで10% TCAを置換し、フィルターを乾燥させた。 フィルターを5 mLのULTIMA GOLDに浸し 14 Cのカウント数を測定した。

2-5. リボソーム会合活性評価

10 μ Lの 5 \times pre-incubation B (526 mM KCl, 55 mM Hepes-KOH(pH7.4) , 8.8 mM Mg(OAc)₂) に、100 mM DTT 0.5 μ Lと100 pmol Stm1、20 pmol Stm1 Δ 80Sを加え50 μ Lになるようにメスアップした後、25°Cで15分間インキュベートした。 それぞれのサンプルに、DilutionB (150 mM KCl , 20 mM Hepes-KOH(pH7.5)) を200 μ L加えた。このとき、最終のMg濃度が各々1.5 , 7 , 13 mMになるようにMg(OAc)₂を加えて調製した。 サンプルを25 °Cで15分間インキュベートした。SW41Ti用のチューブ (Beckman) に5 mLの

10% SDG sol. (5×BBK sol.(100 mM Tris-HCl(pH7.6), 50 mM MgCl₂, 250 mM KCl, 5%[w/v] Sucrose, 1 mM DTT) を30% SDG sol. (5×BBK sol., 30%[w/v] Sucrose, 1 mM DTT) に重層し、16~18時間水平にしてグラジエントを形成した。各サンプルをSDG solution に重層し、390,000 xgで3時間遠心 (Beckman SW41Ti rotor) した。この時、density gradient fractionators (Towa Labo, Model 152-001) を用いて260 nmの吸光度を測定した。

2-6. Western blotting 解析

SDS-PAGE の後、ゲル中のタンパク質を 1.5mA/cm²、60 分の条件でニトロセルロース膜 (GE Healthcare) に転写した。この時 transfer buffer (2.5 mM Tris-HCl, 19.2 mM グリシン, 20% メタノール, 0.05% SDS) を使用した。1 次抗体反応は以下の条件で、blocking buffer (PBS、1%スキムミルク、0.1% Tween 20) の下で行った。感度が低い場合は Can Get Signal (TOYOBO) を使用した。

1 次抗体	希釈率	温度	時間
Stm1	1/1000	25 °C	1 時間
GFP	1/1000	25 °C	1 時間
His	1/1000	25 °C	1 時間

2 次抗体として anti-Rabbit IgG (Sigma) を用い、希釈率 1/1000、25°C、1 時間で反応を行った。検出は ECL (GE Healthcare) 又は ECL Prime (GE Healthcare) を用い LAS4000 によって解析を行った。

Stm1 に対するポリクローナル抗体は、精製組み換えタンパク質をウサギに免疫させることで作成した。

2-7. Single round translocation assay

eEF2 依存的な single round translocation assay は、先行研究(Dinos *et al.*, 2005)に倣った。

Heteropolymeric MFV mRNA は run-off transcription によって転写した(Triana-Alonso *et al.*, 1995)。MFV mRNA の配列は以下の通りである。5'-GGGAAAAGAAAAGAAAAGAAA-AUG-UUC-GUU-AAAAGAAAAGAAAAGAAAUAUUGAAUU-3'。中心部に 3 つのコドン (Met-Phe-Val) または 2 つのコドンと終止コドン (Met-Phe-UAA) を含む。tRNA^{fMet} と tRNA^{Phe} は Sigma-Aldrich から購入し、ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} (N-acetyl-[³H]Phe-tRNA^{Phe}) は逆相 HPLC (Nucleosil 300-5 C4) を用いてメタノール勾配によって精製した(Triana-Alonso *et al.*, 1995)。

5'-end ³²P labeling tRNA^{fMet} ([³²P] tRNA^{fMet}) は、先行研究(Triana-Alonso *et al.*, 1995) に従い作成した。反応は全て binding buffer (20 mM Hepes-KOH(pH7.6)、4.5 mM Mg(OAc)₂、150 mM KOAc、0.05 mM spermine、4 mM 2-mercaptoethanol) の条件下で行った。

5 pmol Stm1Δ80S リボソーム、5 pmol Chis-Stm1 を含む 5 μL の反応系において、RT (room temperature) , 15 分でプレインキュベーションを行うことで、Stm1 結合 80S リボソーム複合体を作成させた。さらに、5 pmol Stm1 結合 80S リボソーム、25 pmol MFV-mRNA、2.5 pmol [³²P] tRNA^{fMet} を含む 12.5 μL の反応液において、37°C、15 分で 1st インキュベーションを行うことで、3 者複合体を形成させた。さらに、2.5 pmol Ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} を加えて (total 25 μL) 、37°C、30 分で 2nd インキュベーションを行い、PRE state complex を形成させた。POST state complex の形成のために、PRE complex に 0.1 mM GTP、5 pmol eEF2 を添加し (total 35 μL) 37°C、10 分間インキュベーションした。

その後、リボソームへの tRNA 結合量を tRNA binding assay で比較した。tRNA binding assay は、サンプルをニトロセルロースフィルターにロードし、binding buffer で洗浄することでリボソームに結合していない ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} および [³²P] tRNA^{fMet} をフィルターから除去した。フィルターを 5 ml Ultima gold に入れ、フィルター上の [³²P] tRNA^{fMet} /ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} の量をシンチレーションカウンターによって解析した。

さらに、P サイト上の ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} 量を定量するために、puromycin assay (最終濃度 0.5 mM puromycin (MP Biomedical) , 37°C, 5 分) を行った。反応後のサンプルは、サンプルと等量の 0.3 M NaOAc (pH5.5)/MgSO₄ を添加することで反応を停止させ、さらに 1 mL の酢酸エチルを加えた。1 分間、ボルテックスで攪拌させた後、氷上で 10 分間静置させた。上層のみを、5 mL Ultima gold に入れ、30 分間振とうさせた後、シンチレーションカウンターで遊離した ac[³H]Phe-puromycin 量を解析した。

この時、バックグラウンドとして、リボソーム非存在下およびピューロマイシン非存在下での値をそれぞれ減算した。

2-8. mRNA/ribosome binding assay

5'-end ^{32}P labeling MFV-mRNA (^{32}P MFV-mRNA) は先行研究(Triana-Alonso *et al.*, 1995)に従い作成した。反応は全て 20 mM Hepes-KOH(pH7.5), 4.5 mM MgCl_2 , 150 mM NH_4OAc , 0.05 mM spermine, 2.0 mM spermidine, 4 mM 2-mercaptoethanol の条件下で行った。

5 pmol Stm1 Δ 80S リボソーム、5 pmol Chis-Stm1 を含む 5 μL の反応系において、RT、15 分でプレインキュベーションを行うことで、Stm1 結合 80S リボソーム複合体を作成した。さらに、5 pmol Stm1 結合 80S リボソーム、25 pmol ^{32}P MFV-mRNA、2.5 pmol tRNA^{fMet} を含む 12.5 μL の反応液において、37°C、15 分で 1st インキュベーションを行うことで、3 者複合体を形成させた。さらに、2.5 pmol of Ac ^{3}H]Phe-tRNA^{Phe} を加えて (total 25 μL)、37°C、30 分で 2nd インキュベーションを行い、PRE state complex を形成させた。POST state complex の形成のために、PRE complex に 0.1 mM GTP、5 pmol eEF2 を添加し (total 35 μL) 37°C、10 分間インキュベーションした。

その後、サンプルをニトロセルロースフィルターにロードし、binding buffer で洗浄することでリボソームに結合していない ac ^{3}H]Phe-tRNA^{Phe} および ^{32}P MFV-mRNA をフィルターから除去した。フィルターを 5 ml Ultima gold に入れ、フィルター上の 5'- ^{32}P MFV-mRNA /ac ^{3}H]Phe-tRNA^{Phe} の量をシンチレーションカウンターによって解析した。

2-9. in vitro peptide transfer assay

in vitro peptide transfer assay は先行研究(Van *et al.*, 1973)に従った。100 pmol Stm1 Δ 80S リボソームと、100 pmol *S. cerevisiae* [^{14}C]Phe-tRNA^{Phe} を用いて、100 μL の反応系において poly(U)poly(Phe)合成を行った。反応は、20 mM Hepes-KOH(pH7.5), 100 mM KOAc, 2.5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0.05 mM spermine, 7.5 mM creatine phosphate, 1.25 μg creatine kinase, 0.1 mM GTP, 20 μg poly(U), 50 U of SuperNaseIn, 1.0% (w/v) PEG6000, 10 pmol of eEF1A and 10 pmol of eEF2 存在下で行い、30°C、60 分間インキュベートした。さらに反応後のサンプルに、100 pmol Chis-Stm1 を加え、RT、15 分間インキュベートした。その後、最終濃度 0.5 mM になるようにピューロマイシンを加え 30°C、10 分間反応させ、10 - 30 % (w/v) sucrose gradient buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.25 mM spermidine) を用いた遠心 (Beckman coulter SW41, 39,000 xg, 3hr, 4°C) による分画をおこなった。この時、density gradient fractionators (Towa Labo, Model 152-001) を用いて、260 nm の吸光度を測定すると共に、分画された 20 フラクションを回収した。

回収されたサンプルのうち 10 μ L をろ紙上にスポットし、5 mL の ULTIMAGOLD に入れ、 $[^{14}\text{C}]\text{Phe}$ 量を液体シンチレーションカウンターを用いて計測した。

2-10. eEF2/Stm1/ribosome binding assay

30 mM GTP, 20 pmol His-Stm1 または 20 pmol truncated Stm1 mutants, 20 pmol eEF2, 20 pmol Stm1 Δ 80S を 100 μ L の反応系において、binding buffer (20 mM Hepes-KOH (pH7.5), 100 mM KCl, 2.5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0.25 mM spermidine, 2 mM DTT) 中で混合した。RT、30 分のインキュベーションの後、氷冷した 200 μ L の dilution buffer (20 mM Hepes-KOH(pH7.5), 100 mM KOAc, 12 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0.25 mM spermidine, 4 mM 2-mercaptoethanol) を加えた。

サンプルを 250 μ L の sucrose cushion (20 mM Hepes-KOH(pH7.5), 100 mM KOAc, 5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0.25 mM spermidine, 4 mM 2-mercaptoethanol, 1 M sucrose) の上に重層し、100,000 rpm、60 min、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件下で TLA100.3 rotor (Beckman Coulter) を用いて遠心した。遠心後の上清を取り除き、ペレットのリボソーム画分を 20 μ L の [2.5/100/0.25] Buffer (20 mM Hepes-KOH(pH7.5), 100 mM KOAc, 2.5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0.25 mM spermidine, 4 mM 2-mercaptoethanol) で懸濁した。懸濁後のサンプルは、Western blotting 解析に使用した。

2-11. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を用いた GTPase 活性測定

5 μ L の Mix1 (100 mM Hepes-KOH(pH7.5), 578 mM KCl, 5 mM DTT) に 1 pmol eEF2 及び 1 pmol Smt1、1 pmol 80S リボソームを加え、milliQ で 25 μ L にメスアップした。これらのサンプルに $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を 0.5 μ L ずつ加えた後、30 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートした。インキュベーション後は速やかに 100 μ L の 0.1N H_2SO_4 -1.5mM NaH_2PO_4 と 25 μ L の 5% sodium molybdate を混ぜたものを加えた。さらに 250 μ L の n-butanol を加え、vortex し、10,000 rpm で 1 分間遠心 (HITACHI himac CF15R T15A22) した。遠心後、2 層に分かれたうちの 上層のブタノール層 200 μ L を 5 mL の ULTIMAGOLD に入れ、 ^{32}P のカウント数を液体シンチレーションカウンターを用いて計測した。

2-12. Regenerating coupled enzyme assay

Regenerating coupled enzyme assay は、先行研究(Barry *et al.*, 1998)に従って行った。キュベットに、20 mM Hepes-HCl(pH7.4), 150 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5mM GTP (Sigma) , 0.5mM NADH (Roche) , 5 mM phosphoenol pyruvate (Roche) , 3.6 µg PK (Roche) , 6 µg L-LDH (Sigma) を加え、吸光度が安定するまで 5 分ほど置いた。安定した後、0.5 µM eEF2, 0.5 µM Stm1 及び 0.5 µM 80S を加え、速やかに混ぜた後、340 nm の吸光度を測定した。反応は全て 120 µL 系で行った。測定は、JASCO V-550 UV/VIS spectrophotometer を用いて行った。

2-13. Cell extract の調製

栄養飢餓状態で生育した菌体の約 2.0 OD₆₀₀ 分に、170 µL の 1.85 M NaOH を加え氷上で 10 分間静置した後、170 µL の 50% trichloroacetic acid (TCA) を加え、さらに氷上で 10 分間静置した。10,000 xg, 2min, 4°C の条件で遠心しペレットをアセトンで洗浄した後、風乾させた。乾燥後のペレットを 60 µL の Urea loading buffer (120 mM Tris-HCl(pH6.8), 5% glycerol, 8 M urea, 143 mM 2-mercaptoethanol, 8% SDS) で溶かした。このサンプルのうち、15 µL を用いて Western blotting 解析を行った。

3. 結果

3-1. Stm1 による翻訳抑制機構の解析

より詳細な Stm1 の機能解析を行うためには、先行研究で行われているような抽出液系での解析に含まれる、内在性の Stm1 や共訳する因子の影響を排除する必要がある。その為本研究では、先行研究で報告されている Stm1 の翻訳伸長抑制効果を検証すると共に Stm1 の機能解析を行うにあたり、本研究室で構築した酵母由来の再構築型無細胞蛋白質翻訳系を用いた。このような純度の高い無細胞系を用いることで、夾雑物や共役因子の持ち込みを最小限に抑えた条件で解析を行った。

また、Stm1 は 80S リボソーム結合能をもつため、野生型 (WT) の出芽酵母から調製した 80S リボソームには残存の Stm1 が含まれている可能性がある。そのため、Stm1 欠損株 (Stm1 Δ) から調製した 80S リボソームを用いることで、内在性の Stm1 の影響を完全に排除した系での解析を行った。

3-1-1. 80S リボソーム上での Stm1 の機能

3-1-1-1. Stm1 による翻訳抑制効果

先行研究において、Stm1 による翻訳抑制能は酵母抽出液を用いた解析により示されている (Balagopal *et al.*, 2011)。抽出液による解析では、内在性の Stm1 や共訳する因子の影響を排除できないと考え、本研究では酵母由来の再構築型無細胞蛋白質翻訳系を用いた、poly(U)poly(phe)合成における Stm1 の効果を検証した。poly(U)poly(phe)合成は、翻訳開始因子や終結因子を必要としない簡易な翻訳系である。poly(U)poly(phe)合成に必須な訳伸長因子である eEF1A と eEF2 および、Stm1 Δ 80S リボソーム存在下で解析を行った。さらに Stm1 は、0, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08, 0.2 μ M ずつ加えた。その結果、Stm1 の濃度依存的な poly(Phe)合成の阻害が見られた (図 5a)。これにより、Stm1 が翻訳を抑制することが再現された。

3-1-1-2. Stm1 によるリボソーム会合促進活性

先行研究において、マグネシウムが 3 mM の条件下で Stm1 は 80S リボソームに結合し、リボソーマルサブユニット間の会合を促進することが示唆されている(Heriberto *et al.*, 2004)。リボソームのサブユニット間の結合の安定性は、マグネシウム濃度に依存することが知られている。このため、本研究において組み換え蛋白質として精製した Stm1 が、リボソームのサブユニット間の安定性が低い条件下（低マグネシウム濃度）においても同様の機能を有するか検証をした。

Stm1 Δ 80S リボソームに対し 5 倍量の Stm1 を加えてインキュベートした後、低マグネシウム条件下（1.5 mM）でショ糖密度勾配遠心法を用いて分画し、リボソームのサブユニット会合の様子を観察した。その結果、Stm1 非存在下の Stm1 Δ 80S リボソームでは、80S のピークが消失し 40S および 60S のピークが見られた。このことから、空の 80S リボソームはサブユニットへ解離していることがわかった。一方で、Stm1 存在下では 80S のピークが観察され、低マグネシウム濃度条件下においても 80S の形成が維持されることが明らかとなった（図 5b）。これにより、Stm1 がサブユニット間の会合促進活性をもつことが示された。

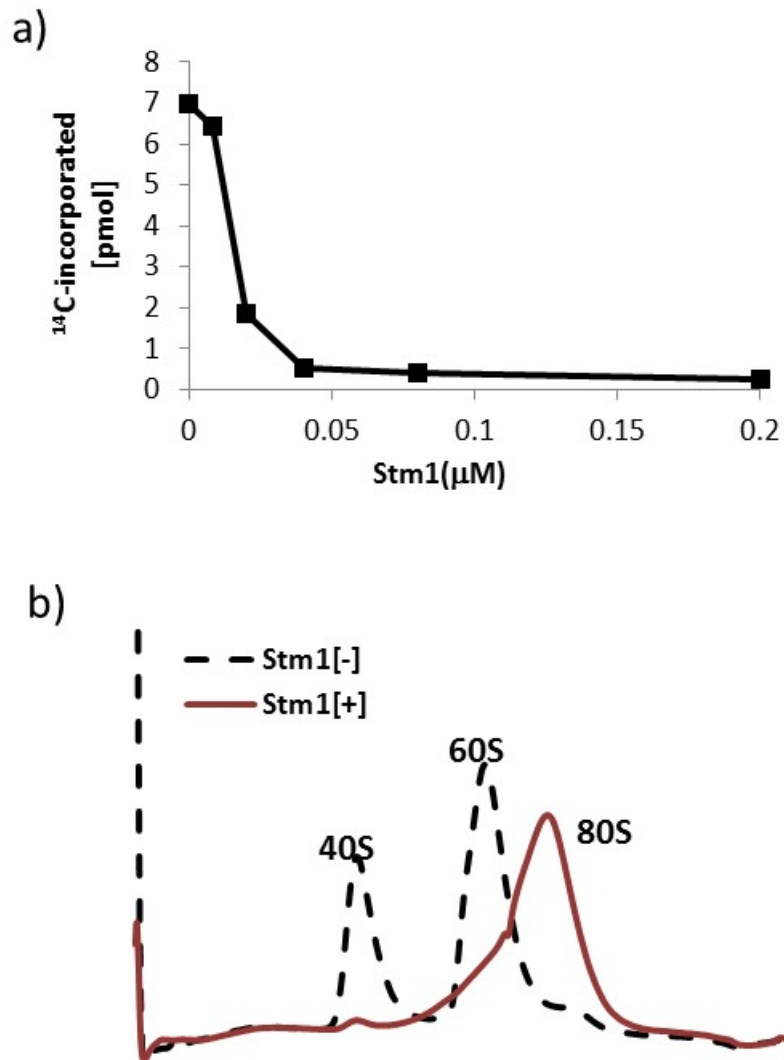


図5 80Sリボソーム上でのStm1の効果

- a) Stm1のpoly(U)poly(Phe)合成系における翻訳阻害効果を解析した。Stm1Δ80Sリボソーム (0.04 μM) , [¹⁴C]Phe-tRNA, eEF1A, eEF2および各濃度のStm1存在下でインキュベートした後、Poly(Phe)の合成量を定量した。
- b) 低マグネシウム濃度条件下(1.5 mM)において、Stm1存在下、非存在下の80Sリボソームのサブユニットの会合の様子を検証した。Stm1(100 pmol)とStm1Δ80Sリボソーム(20 pmol)をインキュベートした。その後、反応液を10-32%のショ糖密度勾配遠心法(SDG)を用いて解析した。80Sリボソームおよび各サブユニットのピークの位置は、それぞれ図中に示した。

3-1-2. Stm1 の変異体解析

上述した通り、Stm1 は 80S リボソームに結合し、翻訳抑制効果を示すことが明らかとなった。ここで、さらに詳細な Stm1 の機能解析のために Stm1 の変異体解析を行った。全長 (FL) の Stm1 の配列を基に、それぞれ N 末端および C 末端の系統的欠失体を作成した (図 6a)。これら 8 つの変異体について、Stm1 Δ 80S リボソームへの結合能と poly(U)poly(Phe)合成での抑制効果を評価した。

まず、ribosome binding assay を用いて各変異体の Stm1 Δ 80S リボソームへの結合能を解析した。各 Stm1 変異体と Stm1 Δ 80S リボソームを混合しインキュベートした後、スクロースクッションを通してリボソーム画分をペレットとして回収した。このサンプルを Stm1 抗体を用いた Western blotting で解析したところ、比較的長い配列をもつ 4 つの変異体 (Δ C180, Δ C143, Δ C107, Δ N47) は FL Stm1 と同等のリボソーム結合活性を持つことが示された。一方で、短い配列をもつ変異体 (Δ C89, Δ C74, Δ N66, Δ N90) においては結合能の減少及び損失が見られた (図 6b)。

次に、各変異体の poly(Phe)合成への影響を調べた。その結果、長い配列をもつ変異体 (Δ C180, Δ C143, Δ C107) では、FL Stm1 とほぼ同等の poly(Phe)合成抑制能を保持していることが示された。一方で、 Δ C89 および Δ C47 変異体は抑制活性の減少がみられた。さらに、より短い配列をもつ変異体 (Δ C74, Δ N66, Δ N90) は、完全に poly(Phe)合成抑制能を失っていることが示された (図 6c)。

この結果から、リボソーム結合能を失った変異体は傾向として翻訳抑制能も失っていることが示された。つまり、翻訳抑制能とリボソーム結合能には相関性があることが明らかとなった。さらに、このような機能は Stm1 の 47-143 アミノ酸領域によって担われていることが示唆された。

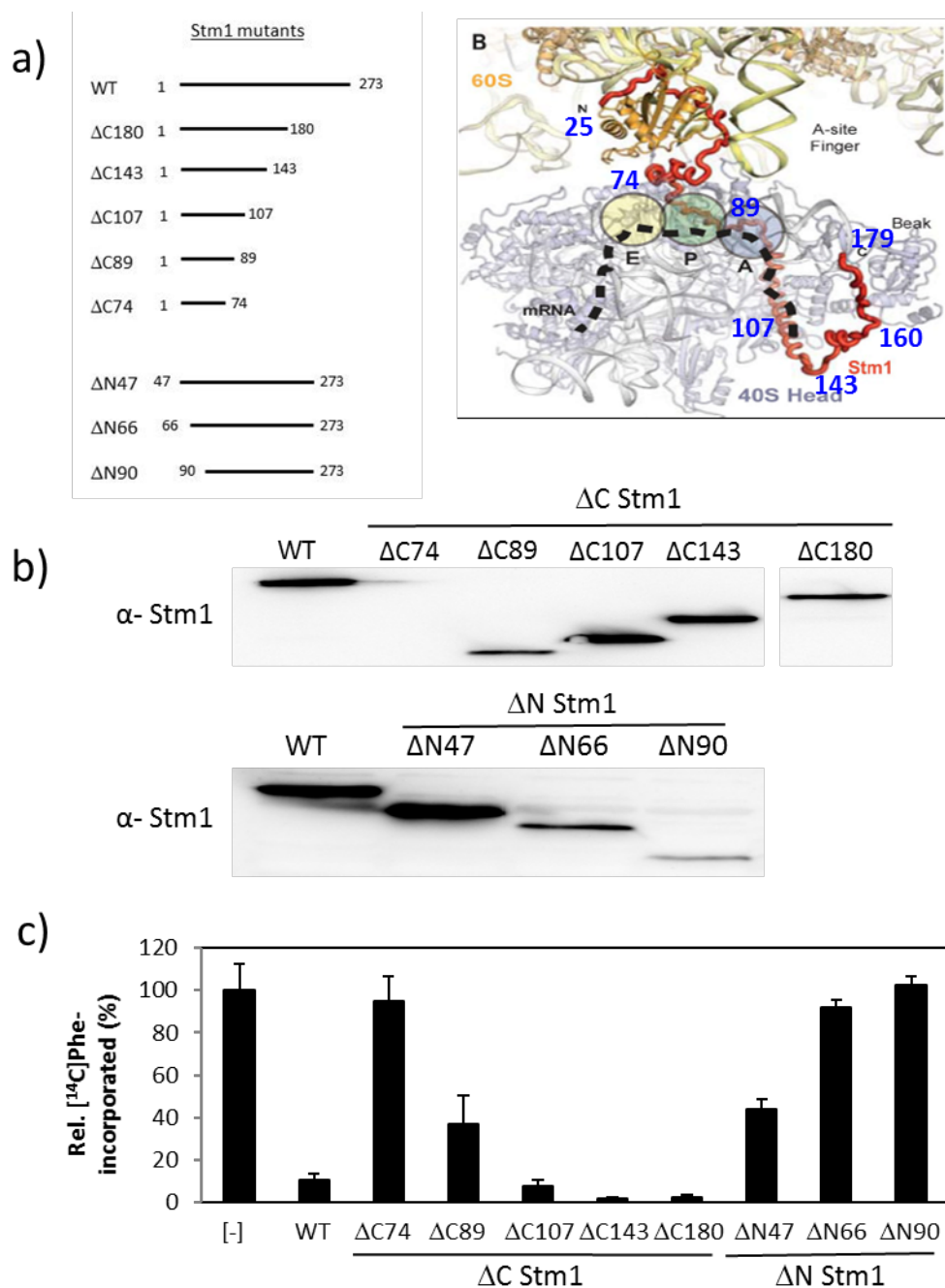


図6 Stm1の変異体解析

- a) (左)全長(FL)のStm1の配列を元に、C末端およびN末端の系統的欠失体を作成した。各変異体の模式図を示した。
(右)先行研究での構造解析結果から、予想されるおよそのアミノ酸の位置を青字で示した。先行研究で得られた構造解析では、N末端およびC末端の配位は明らかとなっていない。
- b) 各Stm1変異体のリボソームへの結合能を調べた。各Stm1変異体とStm1 Δ 80Sリボソームをインキュベートした後、シュークロスクッションを介して、リボソーム画分をペレットとして回収した。回収サンプルを、Stm1抗体を用いたWestern blottingにより解析した(Hayashi *et al.*, 2017)。
- c) 各Stm1変異体のpoly(U)poly(Phe)合成系での翻訳抑制効果を調べた。Stm1 Δ 80Sリボソーム(0.04 μM)、 $[^{14}\text{C}]\text{Phe}$ -tRNA,eEF1A,eEF2および各Stm1変異体存在下でインキュベートした後、Poly(Phe)の合成量を定量した。エラーバーは、3回の実験の標準偏差を示す(Hayashi *et al.*, 2017)。

3-2. 翻訳伸長の各素過程における Stm1 の機能

図 5a で示した通り、Stm1 が poly(U)poly(Phe)合成における翻訳を阻害することが明らかとなった。これは、Stm1 がリボソームや翻訳伸長因子の働きを阻害することで生じていると考えた。そこで、翻訳伸長抑制における Stm1 の分子機序を明らかにするために、翻訳伸長過程の各素過程への Stm1 の効果を検証した。

3-2-1. Single-round translocation assay における Stm1 の効果

まず eEF2 依存的な single-round translocation assay における、Stm1 の効果を検証した (図 7a)。single-round translocation assay では、リボソームの P サイトにデアシル tRNA、A サイトにモデルペプチジル tRNA を配位することで、トランスロケーション前のリボソーム複合体を形成する。ここに、eEF2 を加えることでトランスロケーションを引き起こし、A サイトおよび P サイトの tRNA はそれぞれ P サイトおよび E サイトへ移動する。この時トランスロケーションが生じた割合を、puromycin assay および tRNA binding assay を用いて定量する。

ペプチジル tRNA のモデルとして N-acetyl- ^3H Phe-tRNA^{Phe} (ac ^3H Phe-tRNA^{Phe}) を用い、さらに P サイト上のデアシル tRNA として ^{32}P ラベルした tRNA^{fMet} (^{32}P deacylated tRNA^{fMet}) を用いた。また鋳型として、中心に MFV (Met-Phe-Val) をコードする約 60 ヌクレオチドの mRNA を使用した。この時 Stm1[+]の条件では、反応の一段階目で Stm1 と 80S リボソームをインキュベートすることで、80S リボソームに Stm1 を結合させた。

従って、80S リボソームの P サイトに ^{32}P deacylated tRNA^{fMet}、A-site に ^3H AcPhe-tRNA が配意した複合体を pre-translocation state (PRE) とした。さらに、eEF2 を加えてトランスロケーション反応を促進させ、 ^{32}P deacylated tRNA^{fMet} と ac ^3H Phe-tRNA^{Phe} をそれぞれ、E-site, P-site へ移動させた。この状態の複合体を、post-translocation state (POST) とした。PRE、POST の各複合体の tRNA の結合量は tRNA binding test を用いて比較した。また、eEF2 依存的なトランスロケーションの効率は、puromycin assay によって評価した。puromycin はアミノアシル tRNA の 3'末端のアナログであり、リボソームの A サイト近傍に結合し、P サイト上の peptidyl-tRNA からペプチドの転移反応を引き起こす(Nissen *et al.*, 2000)。その結果生じた peptidyl-puromycin は、リボソーム上にとどまることができないため迅速にリボソームから遊離する。

まず、Stm1 非存在下において、tRNA binding test の結果から PRE 複合体及び POST 複合体上での各 tRNA 結合量が等量であることが確認できた。また、POST 複合体において、結合した ^3H AcPhe-tRNA の 100%が puromycin により反応していることが示された。これにより、Stm1 非存在下において eEF2 依存的なトランスロケーション反応が十分に起きていることが確認された (図 7b)。

一方で、Stm1 存在下では、tRNA binding test の結果から Stm1 非存在下と比べ PRE 複合体上の各 tRNA の結合量は 8 割程度に減少していることが示された。また、Stm1 存在下でのトランスロケーション反応前後の tRNA 結合量を比較すると、POST 複合体における ^{32}P deacylated tRNA^{fMet} 結合量のわずかな減少がみられた。一方で A サイトから P サイトへ移動した ^3H AcPhe-tRNA の 72%が puromycin により反応していることが示された。この結果から、Stm1 存在下では顕著なトランスロケーションの阻害効果は見られませんが、E-site の ^{32}P deacylated tRNA^{fMet} が drop off しやすくなることが示唆された。また、Stm1 存在下において、P-site の ^3H acPhe-tRNA の puromycin assay 活性のわずかな減少がみられた。

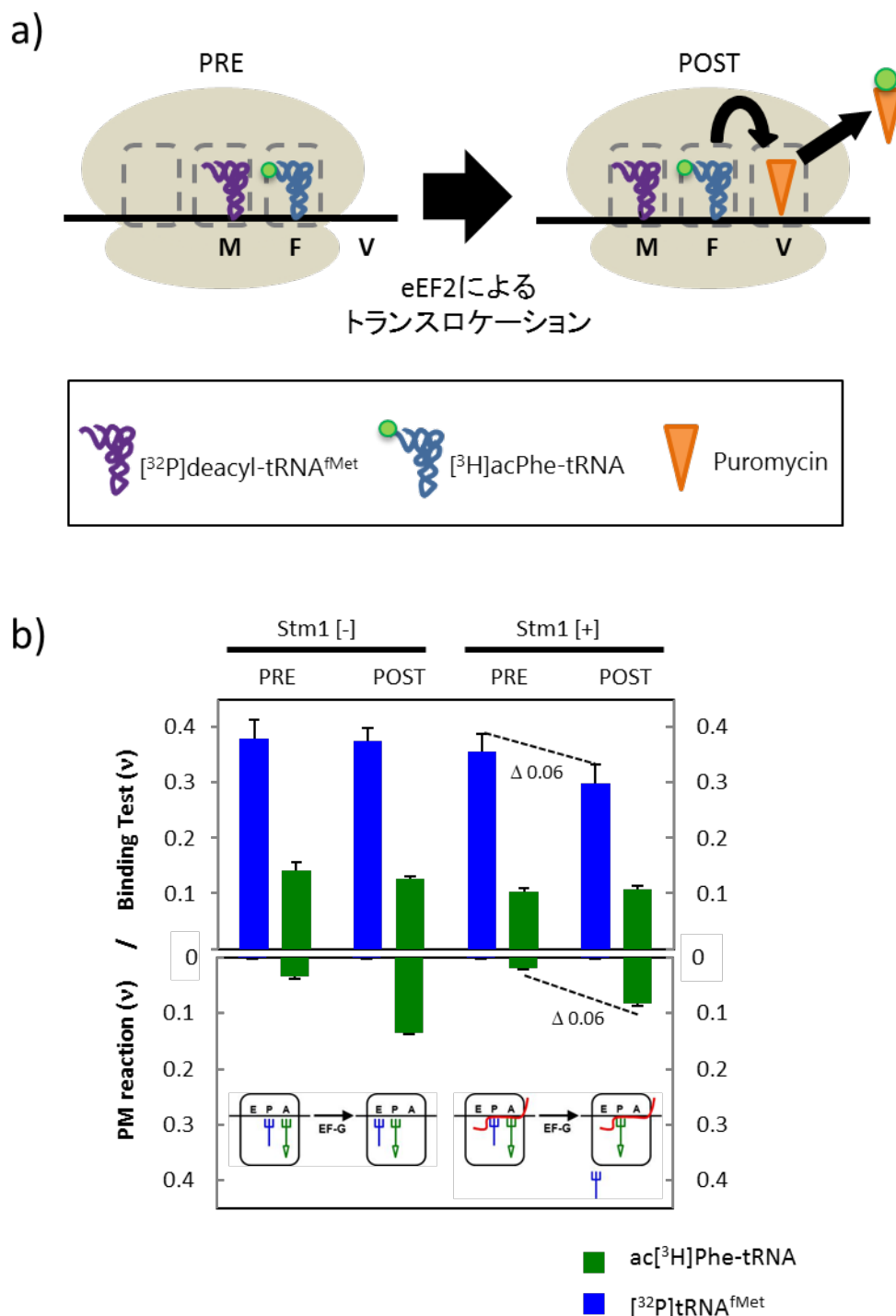


図7 eEF2依存的なsingle-round translocation assay

- a) Single-round translocation assayの概要を示した。eEF2によるトランスロケーションの前のリボソーム複合体をPRE,トランスロケーション後の複合体をPOSTとした。PRE,POSTのリボソーム複合体ごとフィルターにトラップさせ、³Hおよび³²Pのカウントを測定し、tRNAの結合量を定量した。また、トランスロケーションによりAサイトからPサイトへ移動した³H]acPhe-tRNA量はPuromycin assayにより定量した。
- b) Single-round translocation assayにおけるStm1の効果解析した。グラフの上段にBinding TestによるtRNAの結合量を、下段にPM reaction assayによって定量したPサイトのac³H]Phe-tRNA量を示した。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

3-2-2. Stm1 存在下でのリボソームへの mRNA 結合量の比較

前述した通り、Stm1 は 80S リボソーム上で mRNA entry tunnel を通って 40S の head domain と結合することが分かっている。このような構造から、Stm1 はリボソーム上で mRNA の結合を阻害しているのではないかと示唆されている (Ben-Shem *et al.*, 2011)。しかし、リボソーム上での Stm1 と mRNA の挙動は直接的に観察されておらず、Stm1 と mRNA が共存しうるかは不明である。そのため、 $[^{32}\text{P}]$ で 5' 末端をラベルした MFV mRNA ($[^{32}\text{P}]$ mRNA) を用いた single-round translocation assay を行い、Stm1 存在下および非存在下、さらにトランスロケーション前後での mRNA のリボソームへの結合量を比較した。

その結果、Stm1 非存在下において、PRE、POST での mRNA の結合率がほぼ同じであることが明らかとなった (図 8)。これにより、single-round translocation assay においてトランスロケーション前後で mRNA が drop off していないことが確認された。

しかし、Stm1 存在下では、Stm1 非存在下に比べ 80S リボソームへの mRNA の結合率が減少していることが示された。この結果から、Stm1 結合 80S リボソームには mRNA の結合効率が低下することが示された。これにより、*in vitro* 条件下では Stm1 は mRNA のリボソームへのアクセスを部分的に阻害している可能性が示唆された。

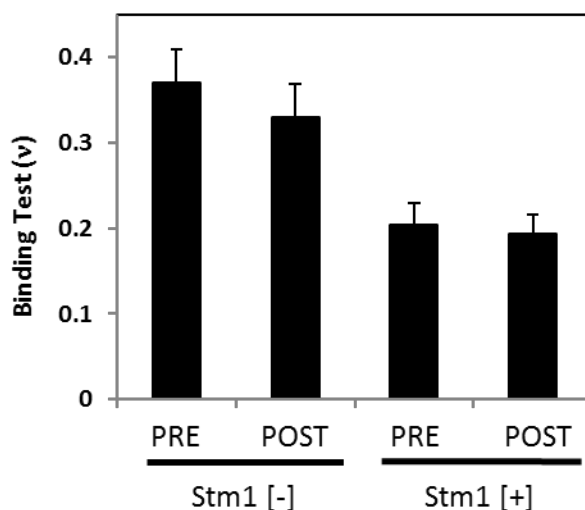


図8 Stm1存在下でのリボソームへのmRNAの結合量の比較

Stm1存在下及び非存在下での、リボソーム上に結合する mRNA量を比較した。 $[^{32}\text{P}]$ で5'末端をRIラベルしたmRNAを用いて、図7と同様の条件でSingle round translocation assayを行ったPRE,POSTの両リボソーム複合体ごとフィルターにトラップさせ、 $[^{32}\text{P}]$ のカウントを測定し、mRNAの結合量を定量した。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

3-2-3. ペプチド転移反応における Stm1 の効果

まず、in vitro peptide transfer assay を用いて、Stm1 存在下、非存在下での puromycin によるペプチド転移効率を調べた。

最初に、poly(U)poly(Phe)合成を用いてペプチド鎖を合成させることで、poly(Phe)鎖と 80S リボソームの複合体（新生鎖・80S 複合体）を作成した。さらにこの新生鎖・80S 複合体と Stm1 をインキュベートすることで、80S 複合体に Stm1 を結合させた。この 80S 複合体に puromycin を加えペプチド転移反応を起こした後、ショ糖密度勾配遠心法により分離し、 $[^{14}\text{C}]\text{Phe}$ 量を測定した。

その結果、Stm1、puromycin 共に非存在下では、新生鎖・80S 複合体上に $[^{14}\text{C}]\text{Phe}$ のピークが観察された（図 9）。これにより、poly(U)poly(Phe)合成により合成したポリペプチド鎖が 80S と複合体を形成していることが確認された。さらに、puromycin を加えると、80S 複合体上の $[^{14}\text{C}]$ のピークは完全に消失し、puromycin によるペプチド転移が起きていることが分かった。

また同様に、Stm1 存在下においても、puromycin 非存在下では 80S 複合体上の新生鎖が確認された。一方で、Stm1 存在下においても puromycin を加えることで新生鎖・80S 複合体上の $[^{14}\text{C}]\text{Phe}$ のピークは完全に消失した。これにより、Stm1 は puromycin によるペプチド転移を阻害しないことが明らかとなった。

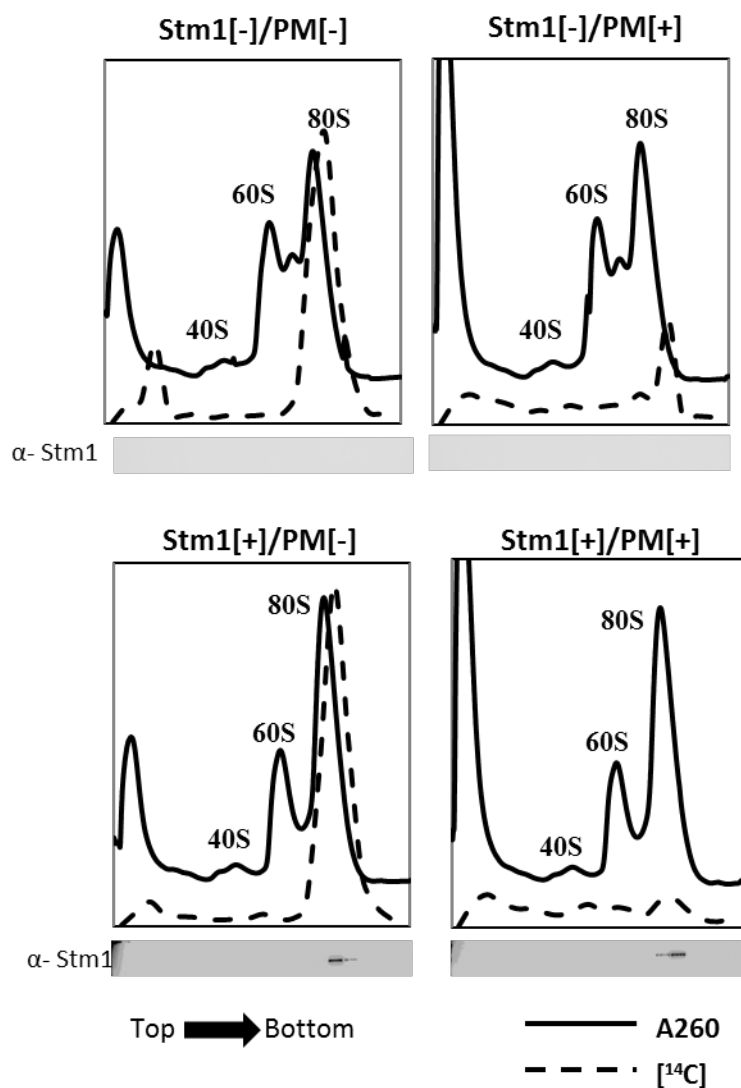


図9 ペプチド転移反応におけるStm1の効果

Stm1のペプチド転移反応における阻害効果を検証した。 $[^{14}\text{C}]$ ラベルされたPheを用いたPoly(U)Poly(phe)合成系により、新生鎖と80Sリボソームの複合体を形成した。この複合体にStm1を結合させ、Puromycinによるペプチド転移反応を起こした。反応液をSDGで分画し、リボソーム(A260)およびペプチド($[^{14}\text{C}]$)の分布を解析した。80Sリボソームおよび各サブユニットのピーク位置は図中にしめた。さらに、各グラフの下にStm1抗体を用いたWestern blottingの結果をしめた。Stm1存在下では、80Sリボソームのピークと同じ位置にStm1のシグナルを観察することができ、これによりリボソーム複合体上にStm1が結合していることを確認した。

3-2-4. Stm1 存在下でのリボソームへの eEF2 の結合量の比較

上述した *in vitro* translocation assay において、トランスロケーション前後での各因子のリボソームへの結合量を Western blotting を用いて解析した。その結果、Stm1 存在下において eEF2 のリボソーム結合量が増大していることが見いだされた。この結果に基づき、eEF2 のリボソーム結合に Stm1 が及ぼす効果について更に詳細に解析した。様々なグアニンヌクレオチド存在下で eEF2 と Stm1 をリボソームとインキュベートした後、反応液をスクロースクッションに通し、リボソーム画分としてペレットを回収した。リボソームに結合している eEF2 量を Western blotting 解析により調べたところ、Stm1・GTP および Stm1・GDP 存在下において eEF2 のリボソームへの結合量の増加がみられた (図 10)。一方で、GTP の加水分解アナログである GDPNP 存在下では、Stm1 存在下においても eEF2 の結合量に影響は見られなかった。

さらに、Stm1 の N 末端および C 末端の系統的欠失体を用いて同様の解析を行った。GTP 存在下で、eEF2 と各 Stm1 変異体をインキュベートした後、反応液をスクロースクッションに通し、Western blotting により eEF2 および各 Stm1 変異体の結合量を比較した。その結果、Stm1 と eEF2 の結合量には相関性があることが示された (図 11)。

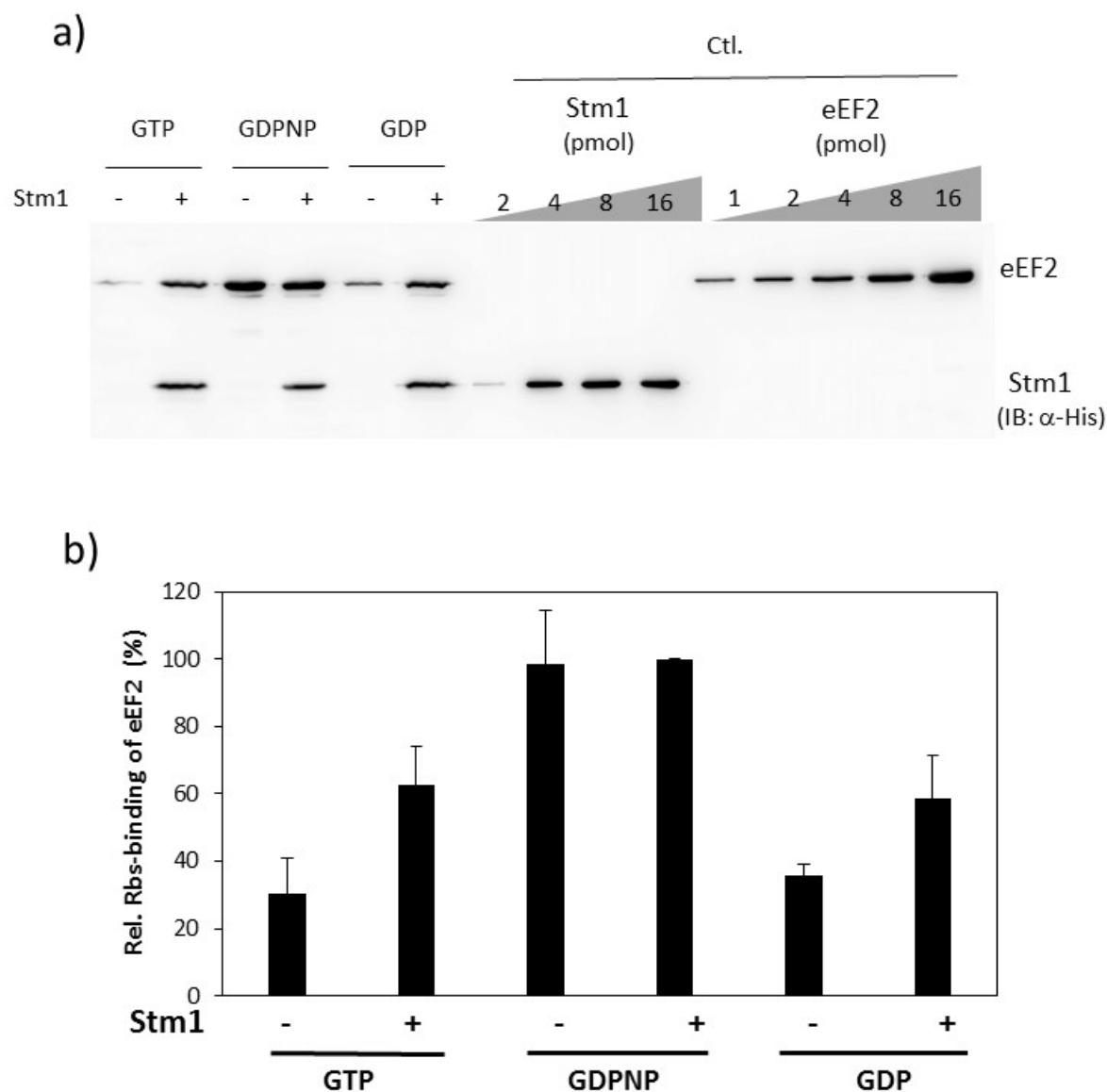


図10 Stm1および様々なグアニンヌクレオチド存在下でのeEF2の結合量

- a) Stm1存在下及び非存在下でのeEF2のリボソームへの結合量を比較した。GTP,GDPNP,GDPの三種類のグアニンヌクレオチド存在下で同量のeEF2とリボソーム(各0.2 μ M)とStm1(0.3 μ M)をインキュベートした後、反応液をスクロースクッションに通し、リボソーム画分を回収した。回収したサンプルを、Hisタグ抗体を用いたWestern blottingにより解析した。この時、C末端にヒスチジンタグをつけたStm1(Chis-Stm1)を使用した。
- b) a)で示したWestern blottingのバンドを定量し、eEF2の相対的な結合量を算出した。この時、GDPNP,Stm1存在下におけるeEF2の結合率を、100%とした。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

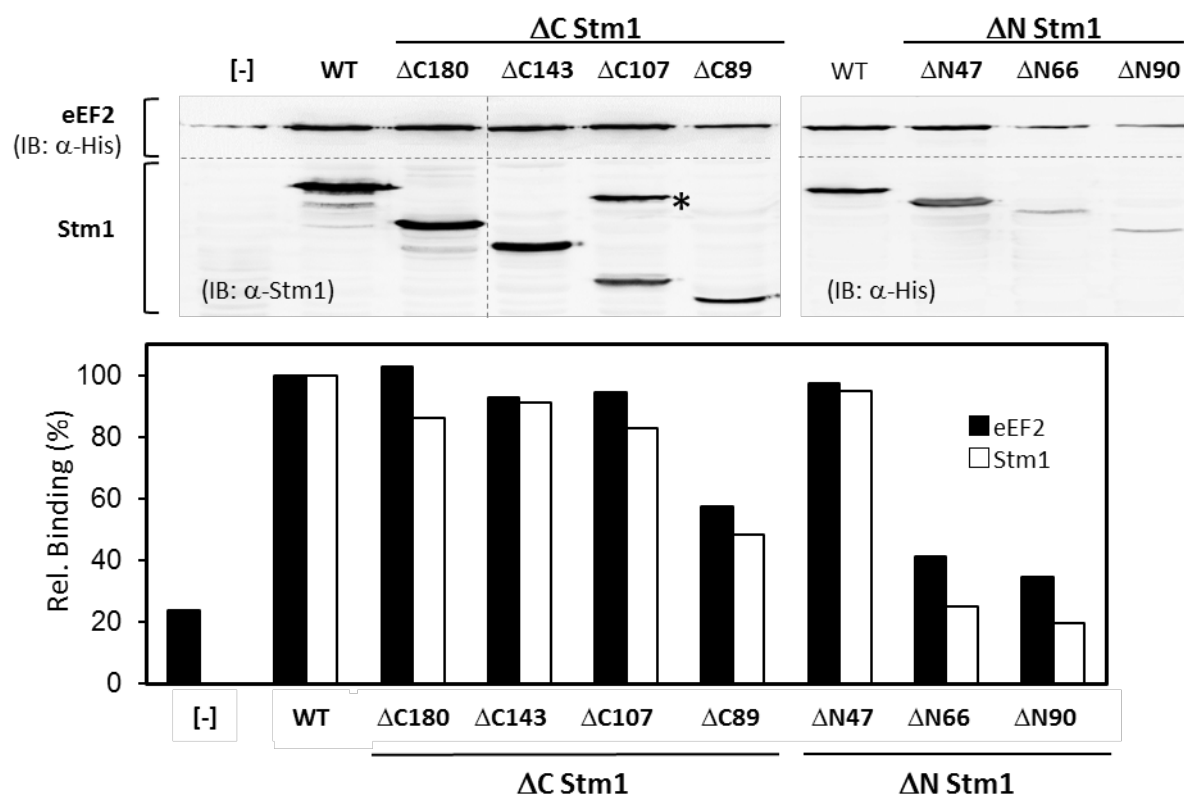


図11 Stm1変異体存在下でのeEF2の結合量の比較

Stm1の各変異体存在下でのeEF2のリボソームへの結合量を比較した。上段にWestern blottingの結果を示した。この時、80SリボソームおよびeEF2(各0.2 μM)とStm1各変異体(0.2 μM)をGTP存在下でインキュベートした。その後、反応液をスクロースクッションに通し、リボソーム画分を回収した。リボソームへのStm1とeEF2の結合の様子を上段のStm1HisタグおよびStm1抗体を用いたWestern blottingで示した。アスタリスクで示したバンドは、夾雑物であると考えている。下段にWestern blottingの結果から定量したeEF2(黒)とStm1(白)の結合率を示した。この時、WTのStm1を用いた時のStm1およびeEF2の結合量を100%として算出した。

3-2-5. eEF2 の 80S リボソーム依存的な GTPase 活性への Stm1 の効果

Stm1 存在下では eEF2 のリボソームへの結合量が増加することが明らかとなったが、この時に eEF2 の 80S リボソーム依存的な GTP 加水分解活性に Stm1 が影響するかを調べた。 ^{32}P で γ 位のリン酸が RI 標識された GTP を用いて、遊離された ^{32}P 量により eEF2 の GTP 加水分解能を評価した。この時、80S リボソーム、eEF2、Stm1 の混合モル比を 1:1:1 とした。

その結果、5 分間のリボソーム依存的な eEF2 の GTP 加水分解活性の見かけ上の K_{cat} は、Stm1 存在下及び Stm1 非存在下において、それぞれ $1.5 (\text{min}^{-1})$ および $3.5 (\text{min}^{-1})$ となった (図 12a)。この結果より、Stm1 によるリボソーム依存的な eEF2 の GTP 加水分解活性の減少が見られたが、加えたリボソーム量 (1 pmol) に対して、過剰量の GTP が反応していることが示された。そのため、反応の初期段階における効果を明らかにする必要があると考えた。

より時間分解的な Stm1 の効果を検証するために、Regenerating coupled enzyme assay を行った。Regenerating coupled enzyme assay の概略図を図に示した (図 12b)。この系では、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の酸化と共役した GTP 再生系を用いることで、NADH の酸化に伴う吸光度 (340 nm) の減少によって、リアルタイムに GTPase 活性を測定している。

まず、GTPase を加えると、GTP が GDP へと変換される。一方で、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) はピルビン酸キナーゼ (PK) によってピルビン酸へと変換され、GDP から再び GTP が生成される。さらに、ピルビン酸は NADH の存在下において、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) によって乳酸へと変換される。同時に、NADH の酸化により NAD^+ が生じる。この時、1 分子の GTP が加水分解を受けると、1 分子の NADH が酸化されるため、NADH の減少速度から GTP 加水分解速度を求めることができる。

反応系に、eEF2/80S および Stm1 の 3 者複合体を加え、NADH の減少量を測定した (図 12c)。反応の直線範囲内 (< 60 秒) でのリボソーム依存的な eEF2 の GTP 加水分解活性の K_{cat} は、Stm1 存在下および非存在下においてそれぞれ、 $8.9 (\text{min}^{-1})$ および $11.1 (\text{min}^{-1})$ となった。この結果より、Stm1 の有無による GTP 加水分解の速度に十分な差は見られないことが明らかとなった。また、先行研究で示された eEF2 の 80S リボソーム依存的な GTP 加水分解活性の K_{cat} 値 ($9.6 (\text{min}^{-1})$) に匹敵するといえる (Nygard *et al.*, 1990)。これより、eEF2 およびリボソーム複合体によるシングルラウンドの GTP 加水分解は、10 秒以内に完了すると考えられる。これらの結果から、Stm1 は少なくとも GTP 加水分解のファーストラウンドにおいて阻害効果を持たないことが示唆された。

また、反応後期における GTP 加水分解活性がわずかに減少した。これは、Stm1 存在下のリボソーム上では、eEF2 上の GDP と GDP の置換反応速度が遅くなるためであると示唆されるが、さらなる検証が必要である。

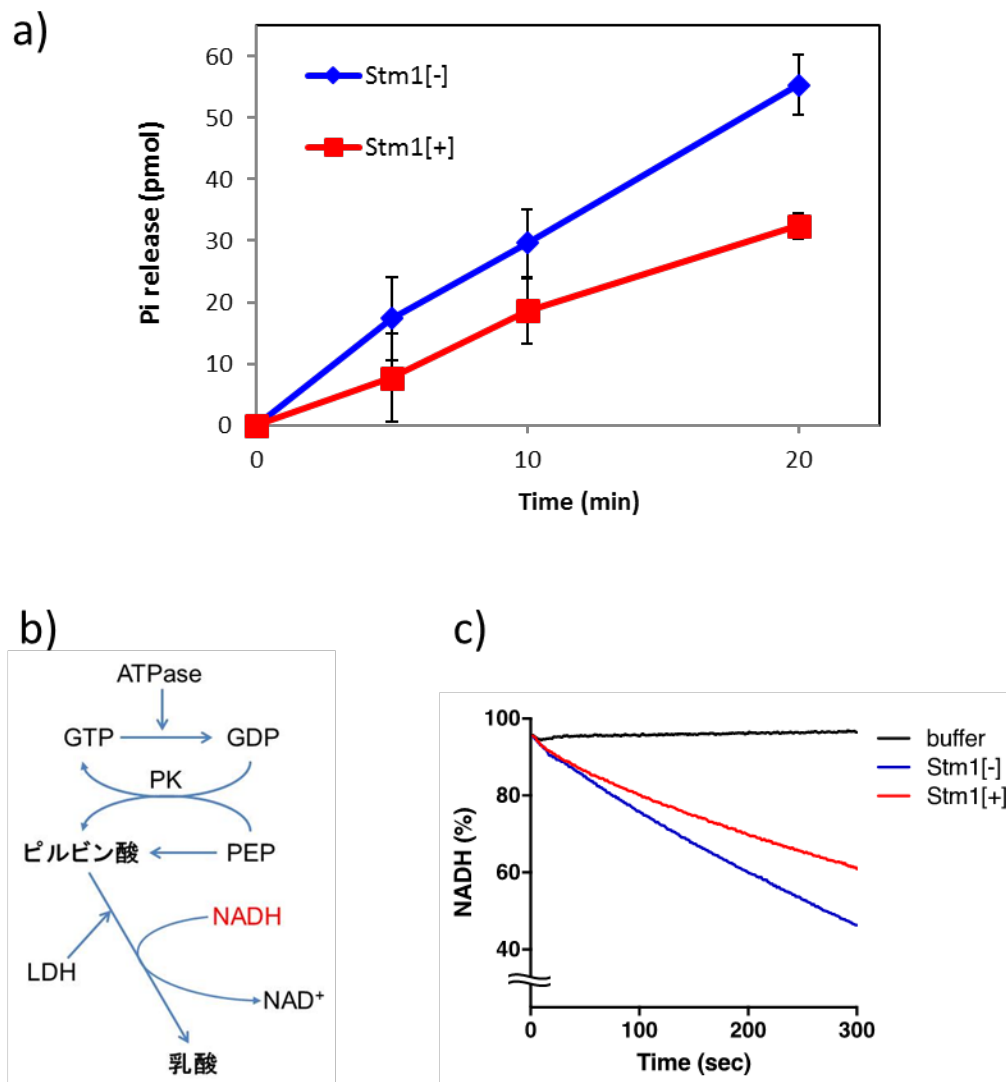


図12 eEF2の80S依存GTP加水分解活性におけるStm1の効果

- a) Stm1存在下、非存在下でのeEF2の80S依存GTP加水分解能を解析した。Stm1存在下、非存在下において80SリボソームとeEF2(各 0.04 μM)を、 γ 位のリン酸が ^{32}P でラベルされたGTP(γ - ^{32}P GTP)とインキュベートした。GTP加水分解によって遊離された ^{32}P 量を液体シンチレーションカウンターにより測定した。反応時間5分間でのeEF2のGTP加水分解活性のKcatは、Stm1存在下、非存在下でそれぞれ1.5(min^{-1}), 3.5 (min^{-1})となった。
- b) NADHの酸化とカップルしたGTPase活性測定の概略図
- c) Stm1存在下、非存在下でのeEF2のGTP加水分解の初速を比較するため、Regenerating coupled enzyme assayを行った。80SリボソームとeEF2(各 0.5 μM)を、0.5 mM GTP, 0.5 mM NADH, 5 mM PEP, 3.6 μg PK, 6 μg LDHと共に、Stm1存在下及び非存在下でインキュベートした。この時NADHの酸化に伴う吸光度(340nm)の減少を観察することで、GTP加水分解速度を算出した。eEF2のリボソーム依存的なGTP加水分解活性のKcatは、Stm1存在下、非存在下でそれぞれ8.9 \pm 3.3(min^{-1}), 11.1 \pm 4.5(min^{-1})となった (Hayashi *et al.*, 2017)。

4. 考察

4-1. Stm1 による翻訳抑制機構

4-1-1. Stm1 によるリボソーム上での eEF2 安定化の分子機構

本研究では、poly(U)poly(Phe)合成における Stm1 の翻訳抑制機序を解析する過程で、Stm1 が eEF2 のリボソーム結合を安定化することを見いだした。Stm1 は GTP 存在下及び GDP 存在下で eEF2 のリボソームへの結合量を増加させ、一方で、GDPNP 存在下では Stm1 による eEF2 のリボソーム結合量への影響は見られなかった。

翻訳伸長過程において、eEF2 は A サイトに peptidyl-tRNA、P サイトに deacyl-tRNA が配位している PRE 状態のリボソームに、GTP 依存的に結合する。この GTP 型の eEF2 は (eEF2・GTP) はトランスロケーションを促進し、A-site、P-site 上の tRNA はそれぞれ P-site、E-site へ移動する。この POST 状態のリボソーム上で eEF2 は GTP 加水分解と Pi リリースに伴い、構造変化をおこすことで GDP 型の eEF2 (eEF2・GDP) はリボソームから解離することができる。

このことから、Stm1 は eEF2 を GTP 結合型の構造に保つことによってリボソーム上安定化していると推察される。GDP 型の eEF2 はリボソームに一過的に結合することが知られている。GDP 存在下においてはおそらく、eEF2 がリボソームに一過的に結合したのち、Stm1 が eEF2 を GTP 型に構造変化させてリボソーム上に安定化したと考えられる。また GTP 存在下では、Stm1 は eEF2 の GTP 加水分解に伴う構造変化を阻害し、リボソームからの解離を抑制したと考えられる。

また、本研究では、eEF2 による 80S 依存的な GTP 加水分解は、Stm1 存在下においても行われることが示された。

以上から、Stm1 による eEF2 のリボソーム安定化機序について下記のような仮説を提唱する。

『Stm1 は、eEF2 の GTP 加水分解や Pi-release 自体を阻害することはできないが、eEF2 の Pi-release に伴う構造変化を阻害し、リボソームからの解離を抑制することで eEF2 をリボソーム上に安定化させる。』

Stm1 はフシジン酸やソルダリンに類似した機能をもつ制御因子であると考えられる。フシジン酸は EF-G や eEF2 を、ソルダリンは eEF2 をターゲットとする抗生物質である。先行研究において、フシジン酸やソルダリンは EF-G/eEF2 による GTP 加水分解を阻害しないが、それらをリボソーム上に固定化することが示されている(Yong-Gui *et al.*, 2009)。

eEF2 は 5 つのドメインからなり (図 13b)、GTP 結合・加水分解ドメインである domain I の状態に連動する各ドメインの構造変化が正常な eEF2 の働きに重要であるが、これらの抗生物質が eEF2 に結合することでその構造変化が阻害される。一方で、eEF2 依存的なシングルラウンドのトランスロケーションや GTP 加水分解及びリン酸のリリースなどの素過程は阻害されない。

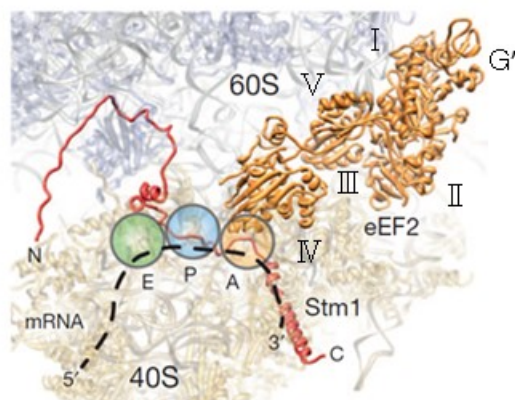
上述した通り、フシジン酸は EF-G および eEF2 をターゲットとする抗生物質であるが、フシジン酸によって固定化された EF-G とリボソーム複合体の構造が、Cryo 電子顕微鏡法による構造解析によって解かれている(Zhou *et al.*, 2013)。この構造から、フシジン酸の結合部位は EF-G の domain I のリボソームとの相互作用により GTP 加水分解反応に重要な役割をもつ switch loop I 領域と重なっており、GTP 型の switch loop I の保存されたコア領域の構造を擬態することで domain I と III との間の相互作用を固定化していることが明らかとなっている。さらに結晶構造解析から、EF-G にフシジン酸が結合することで domain III の構造が変化し、30S サブユニット側の EF-G ドメインである domain IV の構造が EF-G の GTP 結合型に類似する形で安定化されることが示されている(Yong-Gui *et al.*, 2009)。通常、GDP 結合型の EF-G は、domain IV が 30S サブユニットと相互作用を解消する立体構造をとっており、結合が不安定化することで、EF-G はリボソームから解離する。しかし、フシジン酸が結合することでリボソームからの解離に必要な domain IV の構造変化が起きず、GTP 加水分解後もリボソームと EF-G の結合が安定化されるため、リボソームからの解離が阻害されると考えられる。

一方、ソルダリンは真菌の eEF2 に特異的に阻害効果を持つ抗生物質であり(Justice *et al.*, 1998)、フシジン酸同様に eEF2 のリボソームからの解離を阻害することが分かっている。図 13b で示した通り、ソルダリンの結合部位は domain III、IV と V からなるポケット領域であり、domain III の構造変化に伴う domain IV の構造変化を阻害することで、eEF2 のリボソームからの解離を阻害していると示唆されている(Spahn *et al.*, 2004)。このように、EF-G および eEF2 のリボソームからの解離には domain III および domain IV の構造変化が重要であることが示唆される。

本研究による解析では、Stm1 と eEF2 のリボソームへの結合量には相関性があることが示唆された。これにより、リボソームへの結合能に重要な Stm1 のコア領域が eEF2 のリボソーム上での固定化にも重要であることが示された。

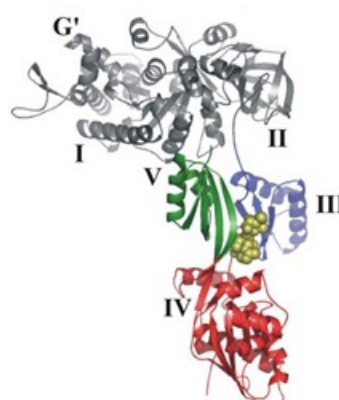
リボソーム上の Stm1 の構造と既知の eEF2 の構造を重ね合わせたモデル構造が示されている(Andreas *et al.*, 2013) (図 13a) 。このモデル構造から、リボソームの A サイト付近の Stm1 のコア領域と eEF2 の domain IV (図 13b) が非常に近接した位置にあることが示されている。このような背景から、Stm1 は eEF2 のドメイン IV と直接相互作用することで、eEF2 を GTP 結合型に保ち、eEF2 のリボソームからの解離を阻害しているのではないかと考えられる。

a)



Andreas M. Anger. et al. NATURE (2013)

b)



Rikke Søe et al., JBC. (2007)

図13 eEF2の構造

- 先行研究において、リボソーム上のStm1とeEF2の構造モデルが得られている。リボソームのAサイト付近でStm1とeEF2のdomain IVが近接していることが示唆される。
- 先行研究で得られた、eEF2単体の結晶構造。eEF2特異的な抗生物質であるソルダリンとの共結晶により、構造が解かれている。eEF2は6つのドメインからなり、各ドメインの構造変化がリボソーム上での機能、およびリボソームからの解離に重要である。ソルダリンは黄色で示した。

4-1-2. Stm1 による翻訳抑制機構

本研究では、Stm1 が poly(Phe)合成を抑制することが明らかとなった。しかし、Stm1 が poly(U)poly(Phe)合成において、翻訳伸長中のリボソームをターゲットとしているかは明らかとなっていない。つまり Stm1 がリボソームに結合可能なタイミングとして、翻訳伸長複合体合成前（翻訳開始過程）、翻訳伸長複合体合成後（翻訳伸長初期段階）および翻訳伸長中の三段階があると考えられる。

先行研究において、結晶構造解析から Stm1 のリボソーム結合部位は mRNA の結合領域と部分的に重なるため、翻訳伸長反応中のリボソーム上では Stm1 と mRNA と安定な共存は難しいことが推測され、そのため Stm1 は翻訳伸長反応には関与できないと予想されている(Andreas *et al.*, 2013)。また本研究室において新しい実験系を導入して検証を行った結果、Stm1 は翻訳伸長中のリボソーム複合体に作用することはできず、マルチラウンド翻訳を抑制していることが示唆された（阿部ら未公表データ）（図 14）。

これらを考慮すると、poly(U)poly(Phe)合成における Stm1 の抑制効果も、翻訳伸長中のリボソームではなく、次の翻訳反応を行う mRNA 上へのリボソームサブユニット会合時に競合的に Stm1 が入り込むことで次のラウンドからの翻訳が阻害されたと推測できる。

つまり、Stm1 はリボソームが新たな mRNA をとらえ開始複合体を形成する過程でリボソームに結合し、伸長サイクルの 1 段階目（もしくはごく初期）で翻訳を抑制していると考えられる。この仮説は、ePURE system を用いた翻訳伸長複合体の解析において、Stm1 存在下において Stm1・mRNA・開始 tRNA・リボソームからなる複合体を優位に検出することができなかったという知見からも支持される（当研究室長井ら未発表データ）（図 15）。もし Stm1 が翻訳伸長中のリボソームをターゲットとするのであれば、上記した 4 者複合体リボソームが形成されるはずである。

また背景でも述べた通り、Stm1 は Dhh1 存在下において pat1Δ株の温度感受性を相補するマルチコピーサプレッサーとして分離されており、Dhh1 の機能を促進する因子であると示唆されている(Vidya *et al.*, 2009)。そして、Pat1 および Dhh1 はデキャッピングを促進し、48S 開始複合体の合成や、翻訳開始抑制に関与する因子である(Coller *et al.*, 2005)。このような先行研究からも、Stm1 が翻訳開始過程に関与していることが示唆される。

現在のところ、Stm1 による eEF2 の安定化によって翻訳抑制がひき起こされるとは考えておらず、Stm1 によって何らかのメカニズムによって翻訳停止がひき起こされた結果、eEF2 結合 80S リボソームが蓄積すると考えている。

最近、飢餓状態などのストレス条件下では mRNA が結合していない空のリボソーム上に eEF2 が結合した状態で蓄積することがヒト細胞において観察されている (Botao *et al.*, 2016)。Stm1 も栄養飢餓時などのストレス条件下で、eEF2 が結合した状態でリボソームを蓄積させているのではないかと考えられる。

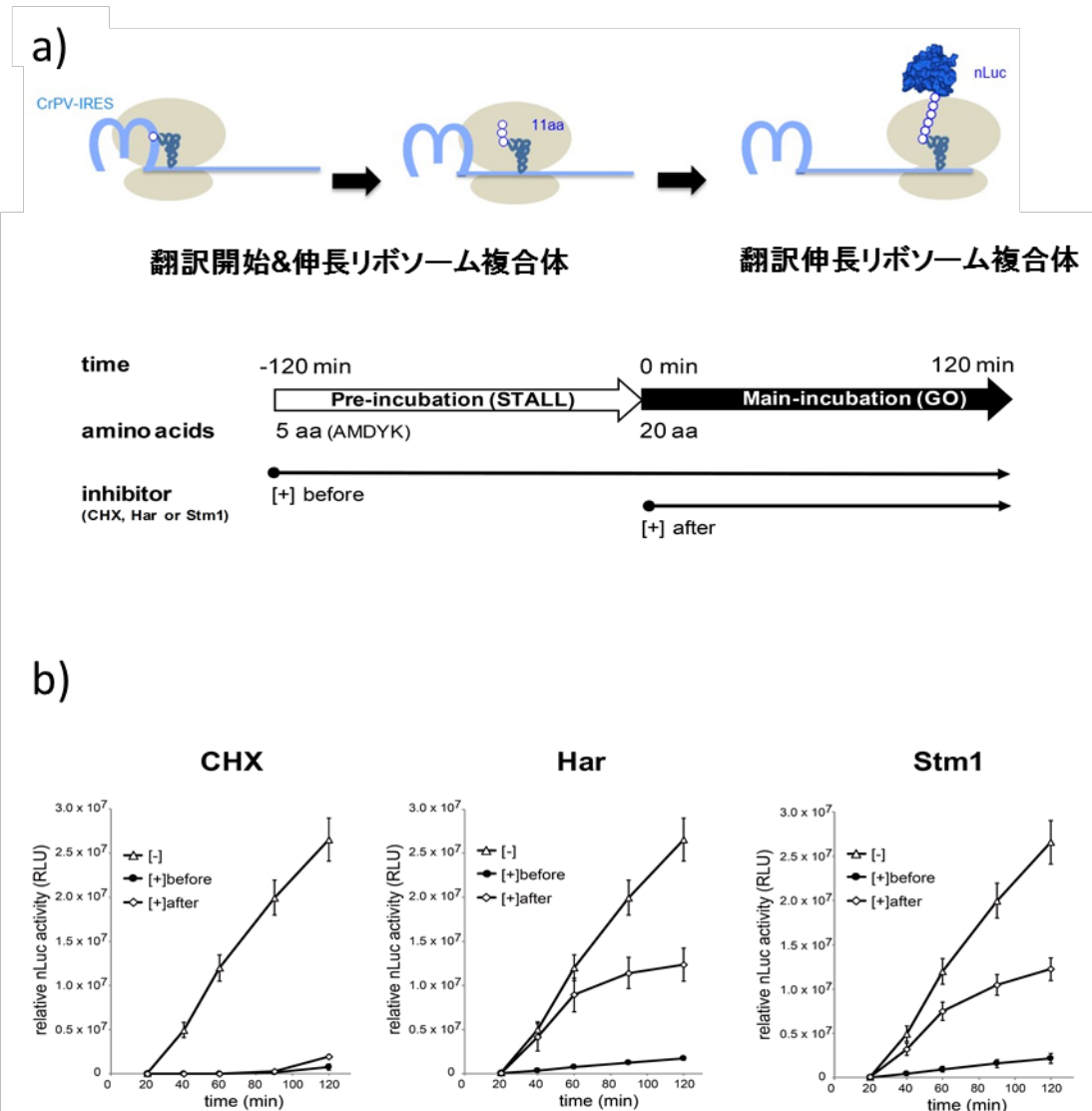


図14 Stm1の翻訳伸長中のリボソーム複合体への阻害効果

本研究室の阿部らが新たな実験系(STOP&GO translation assay)を導入し、Stm1の翻訳伸長中のリボソームへの作用を解析した。

- a) STOP&GO translation assay の概要を示した。mRNAのN末端にCrPV-IRESを含むmRNAを用い、翻訳開始リボソーム複合体を形成した。この時5つのアミノ酸のみを加え翻訳を開始させ、CrPV-IRES以降の配列は11a.a.を形成した段階で翻訳が一時停止するようにデザインしている(Pre-incubation)。2時間反応させた後、以降の翻訳に必要な全種のアミノ酸を加え、翻訳伸長反応を進めた(Main-incubation)。Pre-incubation中のリボソーム複合体は翻訳開始&翻訳伸長段階に相当するとし、Main-incubation中のリボソーム複合体は翻訳伸長中の状態に相当すると考えている。翻訳阻害因子(Cycloheximide(CHX),Harringtonine(Har),Stm1)は、Pre-incubationもしくは、Main-incubation前に加えた。Main-incubation中に合成されたLuciferase(nLuc)の活性を測定し、翻訳阻害の指標とした。
- b) 各翻訳阻害因子存在下での、Main-incubation中の時間ごとのnLuc活性を示した。CHXはPreおよびMain-incubationの両方で、阻害効果を示すことが示された。Harringtonineは、80Sリボソームではなく、フリーの60Sサブユニットに結合することが知られている。本解析においても、Pre-incubationにおいて優位な阻害効果を示した。Stm1存在下においても、Pre-incubationにおける優位な阻害効果が観察された。これらの結果より、Stm1の翻訳阻害効果は翻訳伸長中のリボソームには作用しないことが示唆された。

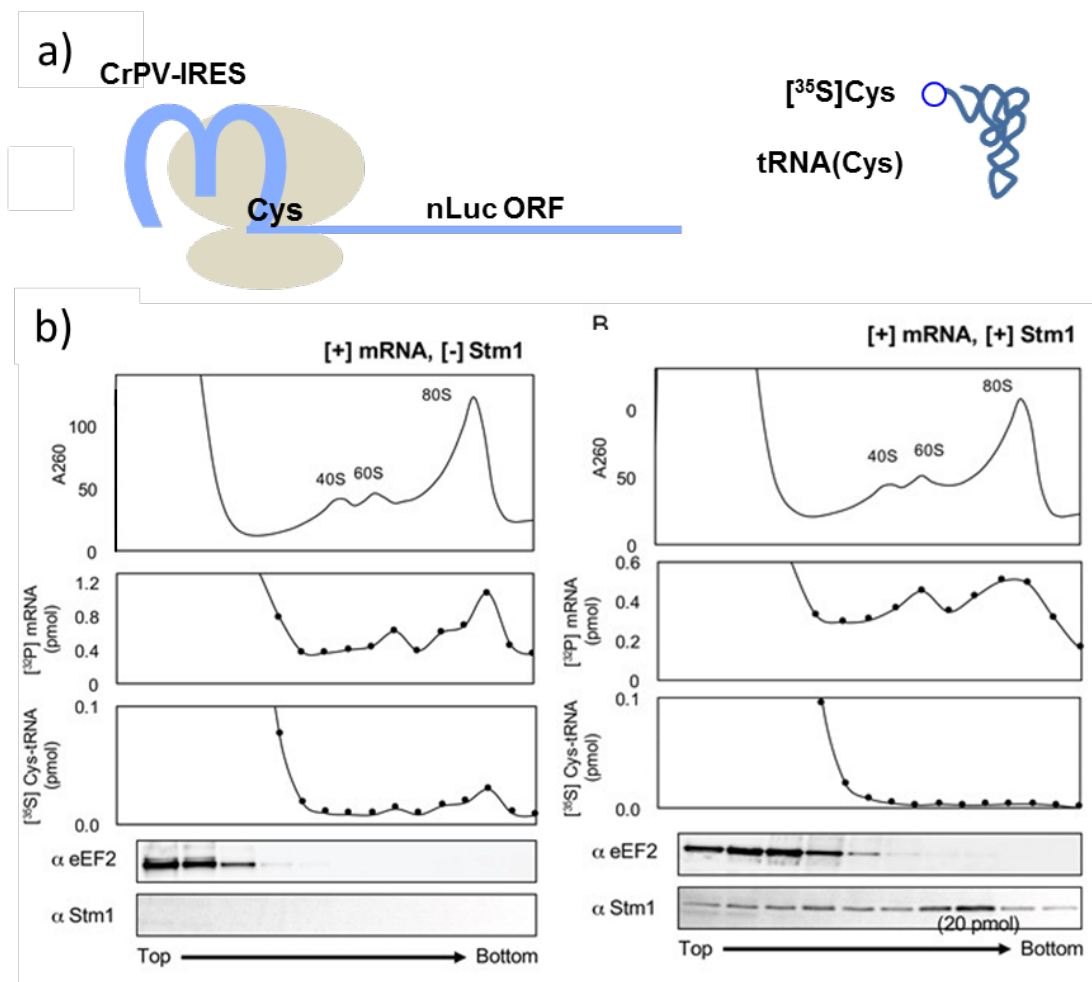


図15 ePUREsystemを用いたStm1の翻訳抑制機能解析

Stm1が、リボソームサブユニットの会合時にリボソームに結合し、翻訳伸長の一段階目に作用する可能性について検証を行った。ePURE systemを用い、Stm1存在下および非存在下においてmRNA・開始tRNA・リボソームの複合体を検出した。

a) 本解析で使用したmRNA及び開始tRNAの模式図を示した。mRNAのN末端にCrPV-IRESを含み、nLuc ORFを持つmRNAを用いた。この時、nLuc ORFの一番目の配列に単一のCysコドン配置し、残りのORF配列内の全てのCysコドンにAlaへと置換した。さらに、開始tRNAとなるCys-tRNAを $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ を用いてラベルし、 $[^{35}\text{S}]\text{Cys-tRNA}$ とした。一方で、mRNAも $[^{32}\text{P}]$ ラベルした。これらの因子を用いて、Stm1存在下及び非存在下で翻訳伸長反応を開始させた。インキュベート後、SDGで反応液を分画しリボソーム(A260), mRNA, 開始tRNAの分布を解析した。さらにWestern blotting解析により、複合体へのeEF2とStm1の結合を確認した。

b) 左にStm1非存在下、右にStm1存在下での解析の結果を示した。発現したnLuc活性を比較し、Stm1存在下でPoly(U)poly(Phe)合成系と同様の翻訳阻害が起きていることは確認された(データ示さず)。Stm1非存在下では、80Sリボソームのピーク(A260)と同じ位置に、mRNAと開始tRNAのピークがほぼ重なっていることがわかる。これは、翻訳伸長が進み、3者複合体が形成されていることを意味する。eEF2はトランスロケーションの度にリボソームへの結合と解離を繰り返しており、リボソーム上には結合していないこともWestern blottingの結果から確認できる。一方でStm1存在下においては、80Sリボソームのピークと同じ位置にmRNAのピークが見られるが、Stm1非存在下に比べると結合量が少ないことが示された。また開始tRNAのピークは見られず、Stm1存在下では開始tRNAがリボソーム上に結合できないことが示唆される。また、Western blottingの結果からリボソーム上のStm1とeEF2も検出されなかった。

4-1-3. Stm1 と eEF3 による翻訳伸長制御

先行研究により Stm1 と eEF3 の発現レベルに相関性があることが示唆されているが、機能的な相関性は明らかになっていない(Van Dyke *et al.*, 2009)。

このため、本研究において Stm1 と eEF3 の機能的な関係を調べるために、Stm1 および eEF3 存在下での poly(U)poly(Phe)合成を行った。その結果、過剰量の eEF3 を反応系に加えることによって Stm1 による翻訳抑制効果が解消されることが示唆された (図 16)。

4-1-2 で議論したように、これまでのところ Stm1 が翻訳伸長の抑制に関与するか証拠は得られておらず、むしろ、Stm1 が翻訳伸長中のリボソーム複合体には結合できないという知見を得ている (阿部ら未公表データ) (図 14)。一方で、single-round translocation assay の結果は、予め Stm1 が結合したリボソームにも mRNA が結合することができ、翻訳伸長反応が少なくとも 1 サイクル進むことを示唆していた (図 7)。生体における翻訳中のリボソーム上では、様々な因子やイベントの競合がおきており、特定の条件下では、Stm1 が結合したリボソームが mRNA と結合し、更には翻訳を進める可能性も排除できないと考えている。

eEF3 は、60S サブユニットのリボソーマルタンパク質 L1 の構造変化を引き起こし E サイト tRNA の解離を促進することで、円滑な伸長反応に関与する因子であると考えられている。従って、Stm1 による poly(Phe)合成の抑制を eEF3 が解消するという実験結果 (図 16) は、eEF3 の供給により、Stm1 の翻訳抑制効果が結果的に打ち消されてたのではないかと考えられる。

Stm1 が結合したリボソームは、eEF3 の存在下でのみ翻訳伸長を進めることができるというモデルを考えている。このモデルと一致して、Stm1 が結合したリボソームに eEF3 を添加しても Stm1 はリボソーム解離しない (データ示さず)。

4-1-2 で考察したように、Stm1 は eEF2 の安定化とは関わりなく翻訳を阻害すると考えている。Stm1 と E-site 因子 (E-site デアシル tRNA や eIF5A) が共精製されてきた 80S リボソームの結晶構造が報告されているのは興味深い (E-tRNA/Stm1/80S や eIF5A/Stm1/80S) (Anger *et al.*, 2013; Melnikov *et al.*, 2016)。Stm1 は E-site 因子を固定化して翻訳伸長を阻害し、これを eEF3 が解消するというモデルが考えられる。

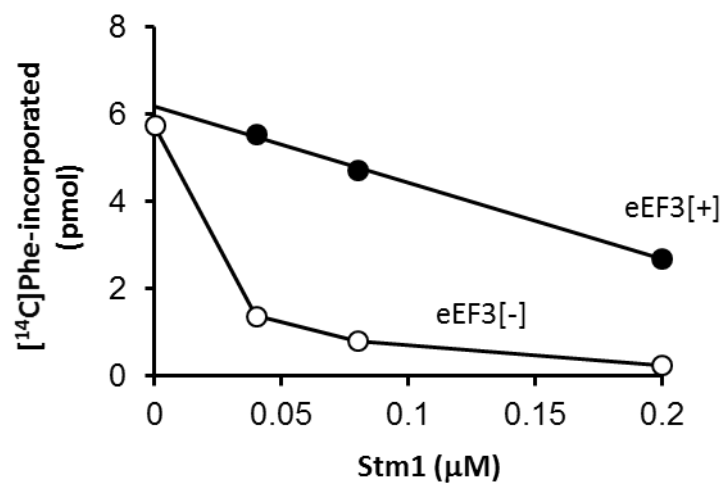


図16 eEF3によるStm1の抑制機構の解消

Stm1の翻訳抑制機構におけるeEF3の効果、poly(U)poly(Phe)合成を用いて解析した。リボソーム(0.04 μM), [¹⁴C]Phe-tRNA, eEF1A, eEF2, eEF3 (0.4 μM)および各濃度のStm1存在下でインキュベートした後、合成されたPoly(Phe)量を定量した(Hayashi *et al.*, 2017)。

4-1-4. Stm1 の C 末領域の役割

本研究より、Stm1 の 144 アミノ酸以降を欠失させた C 末領域欠失変異体は、リボソーム結合能および poly(Phe)合成抑制効果に影響しないことが明らかとなった。また、この領域を含む Stm1 の C 末領域は、リボソームとの複合体構造では、リボソームの外部表面領域に位置することが示されている(Ben-Shem *et al.*, 2011)。

一方で、先行研究において Stm1 の組み換え変異体である Stm1 Δ 240-244 変異体を酵母抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系に加えた場合、翻訳抑制効果の減少や、dhh1 Δ 株の成長障害の抑制、pat1 Δ の温度感受性の相補機能の欠損などが生じることが報告されている(Balagopal *et al.*, 2011)。これらのことより、Stm1 の C 末領域の役割として、Pat1 や Dhh1 との相互作用が関与している可能性が考えられる。

Pop2 はデアデニレース複合体である Ccr4-Pop2-Not 複合体の構成員である。Pop2 は、先行研究において mRNA の 3'UTR で Ccr-Not 複合体および Dhh1、Dcp1 をリクルートする因子であることが示唆されている(Goldstrohm *et al.*, 2006) (図 17)。さらに、Dhh1 は Pat1 と共に decapping enzyme (Dcp1/2) をリクルートしデキャッピングを促進する因子である。したがって、Stm1 は Pop2 のような機能を持ち、Ccr-Not 複合体と相互作用する因子ではないかと考えている。さらに、デアデニレースのリクルートに伴い、デキャッピング酵素もリクルートされる可能性も考えられる。

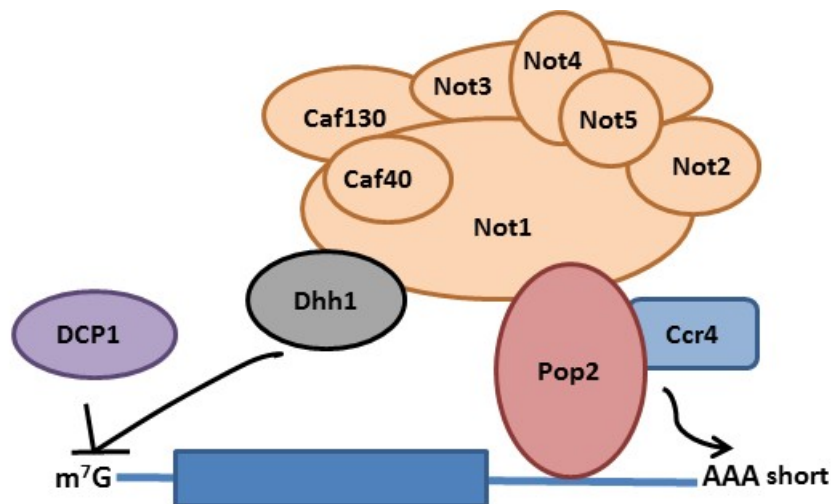


図17 Pop2の機能モデル

Pop2はmRNAに直接結合し、Ccr4,Dhh1,Dcp1を含む複合体をリクルートする因子である。Pop2およびCcr4はpoly(A) tailの短縮化に関与し、一方でDcp1とDhh1はデキャッピング酵素として機能する。

Aaron C Goldstrohm *et al.*, NAT. STRUCT. MOL. BIOL.(2006)より改変

5. 今後の展望

以下に、Stm1 の生理的役割を理解するため取り組んだ解析結果についてまとめた。今後、再現性を確認しながら検証を進めたい。

5-1. Stm1 の生理的役割の解明

諸言で述べた通り、Stm1 欠損株ではラパマイシ感受性を示すことから、栄養飢餓状態における翻訳の制御に関与することが示唆されている。

また、栄養飢餓状態でのリボファジーに必須である脱ユビキチン化酵素複合体の Ubp3-Bre5 の欠損株においても同様に、ラパマイシン感受性を示すことが明らかになっている (Kraft *et al.*, 2008)。これは、栄養飢餓状態におけるリボファジーが正常に働かずに生育阻害を引き起こしたためであると考えられる。これにより、リボファジーの誘導が栄養飢餓状態での細胞の維持に非常に重要な機構であることが示唆されている。

先行研究において、Stm1 を大量発現させた場合に、Stm1 がモノユビキチン化修飾を受けることが報告されている (Van Dyke *et al.*, 2009)。モノユビキチン化された Stm1 (Ub-Stm1) の役割については明らかになっていないが、液胞のプロテアーゼ欠損株でのみ Ub-Stm1 が検出されることから、Ub-Stm1 は液胞内で速やかに分解されと考えられる。

またモノユビキチン化修飾自体の役割についてもよく理解されていないが、エンドサイトーシス経路を介したリソソームへのタンパク輸送と分解に必要である例が報告されている (十島二郎ら(2010) 生化学みにれびゅー)。

このような背景から、栄養飢餓状態において、80S リボソーム上でモノユビキチン化修飾を受けた Stm1 がリボファジーを促進するのではないかと考えた。Stm1 欠損株ではリボファジー不全となったために、ラパマイシン感受性を示したのではないかと推測される。

5-1-1. リボファジーにおける Stm1 の役割についての解析

まず Stm1 のリボファジーへの関与を確かめるために、WT 株および Stm1 欠損株でのリボファジーの検出を行った。

リボファジーを検出するために、40S サブユニットの S20 タンパク (Rps20) に GFP をタグ付けした (Rps20-GFP)。Rps20-GFP はリボソームに取り込まれるため、通常の栄養状態では Rps20-GFP を含む 80S リボソームは細胞質中に存在する。しかし、飢餓状態に 15~20 時間程度さらされると、リボファジーが誘導され、リボソームは液胞へと運ば

れた後にプロテアーゼによる分解を受ける。しかし、Rps20 から切り出された GFP は液胞内の蛋白質分解酵素に耐性を示すため安定的に液胞へ蓄積する(Kraft *et al.*, 2008)。そのため、Rps20-GFP と切り出された GFP の量比によってリボファジーの進行を評価できる。通常の栄養状態から、飢餓状態に移行した後に経時的に回収した細胞の全抽出液を、GFP 抗体を用いた Western blotting を用いて解析した。

WT 株では飢餓状態に移行して 10 時間後から、切り出された GFP を確認することができた。飢餓状態で 24 時間培養した時の Rps20-GFP に対する切り出された GFP 量を 1 arbitrary unit (a.u.) とし、各時間での切り出された GFP の割合をプロットした。Stm1 欠損株においても同様に、切り出された GFP の割合を算出した。その結果、WT 株と比べて Stm1 欠損株においては、リボファジーが抑制されていることが示唆された。さらに Stm1 欠損株に WT の Stm1 が発現するプラスミド (+Stm1p) を形質転換させた株では、WT と同等のリボファジーが検出された。これにより、Stm1 欠損株に Stm1 を相補させた株ではリボファジーが回復することが示唆された。さらに、Stm1 変異体解析によりリボソーム結合能を失っていることが確認された N 末欠失体 (Stm1 Δ 66) が発現するプラスミドを、Stm1 Δ 株に形質転換した株でのリボファジーの検出を行った。その結果、リボファジーの回復は見られなかった。これらの結果から、Stm1 が栄養飢餓状態におけるリボファジーに関与することが示唆された。

5-1-2. Stm1 のユビキチン化の役割についての解析

次に、Stm1 のユビキチン化修飾のリボファジーへの影響を調べた。

酵母の内在性タンパク質では、ユビキチン化サイトの網羅的な解析が行われている(Lea *et al.*, 2012)。この先行研究により同定された Stm1 の主要な 2 ヶ所のユビキチン化サイトを、アルギニン置換した変異体 (K170-171R, K184R) を作成した。このユビキチン化サイトを欠損させた Stm1 変異体が発現するプラスミド (+Ub Δ Stm1) を Stm1 欠損株に形質転換し、リボファジーの検出を行った。その結果、Ub Δ Stm1 存在下でも WT と同等のリボファジーが検出された。この結果から、Stm1 の主要なユビキチン化サイトを失った変異体においてもリボファジーが誘導されることが示唆された。

5-1-3. リボファジーにおける **Stm1** の役割についての考察

上記の **Rps20-GFP** を用いたリボファジーアッセイから、**Stm1** 欠損株では栄養飢餓条件下でのリボファジーの抑制が示唆された。さらに、**Stm1** 欠損株に野生型の **Stm1** が発現するプラスミドを相補させた場合、リボファジーの回復が示唆された。また、リボソームに結合できない **Stm1** 変異体 ($\Delta 66$) 損在下では、リボファジーの回復は見られなかった。

これにより、生体内の役割として **Stm1** はリボファジーに関与することが示唆された。

また今回、ユビキチン化された **Stm1** がリボファジーを誘導する可能性についても検討したが、ユビキチン化サイトを欠失させた変異体 (**Ub Δ Stm1**) もリボファジーを誘導する結果が得られた。一般的にユビキチン化反応は特異性が低く、主要な修飾部位を欠失させると他の箇所がユビキチン化を受ける例が知られている。リボファジーにおける **Stm1** のユビキチン修飾の役割については更なる解析が必要である。

これまで、リボソーマルサブユニットの **60S** と **40S** はそれぞれ別の経路によってリボファジーのターゲットになることが示唆されており、**80S** リボファジーの存在は明らかにされていない。さらに、**60S** リボファジーを同定した先行研究では、栄養飢餓感受性株からスクリーニングを行いリボファジー不全となる株の同定を行っている。**Stm1** はこのスクリーニングで同定されていないことから、**60S** リボファジーとは独立した経路でリボソームの液胞での分解に関与していると示唆される。

6. 総括

本研究では、酵母における翻訳伸長制御機構の理解を目指し、non-canonical な翻訳伸長制御因子と示唆されていた **Stm1** の機能解析をおこなった。

in vitro 翻訳系を用いた解析により、**Stm1** は翻訳抑制能を示し、その翻訳抑制効果は **eEF3** によって解消されることを明らかにした。**Stm1** が翻訳伸長過程を阻害している証拠は得られなかった。

Stm1 がコア領域 (aa 47-107) を介して、フシジン酸様のメカニズムで **eEF2** をリボソーム上に安定化することを発見した。すなわち、**Stm1** は **eEF2** の GTP 加水分解や Pi-release 自体を阻害することはできないが、**eEF2** の Pi-release に伴う構造変化を阻害し、リボソームからの解離を抑制することで **eEF2** をリボソーム上に安定化させることが示唆された。**Stm1** による **eEF2** の安定化はストレス条件におけるリボソームの貯蔵の状態を反映していると推察された。

今後は、**Stm1** による翻訳抑制の分子機構、リボファジーや Ribosome-bound quality control (RQC) における **Stm1** の生理的役割、などが研究課題である。

7. 参考文献

- Andersen, C.B., Becker, T., Blau, M., Anand, M., Halic, M., Balar, B., Mielke, T., Boesen, T., Pedersen, J.S., Spahn, C.M., Kinzy, T.G., Andersen, G.R. & Beckmann, R. 2006, "Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site", *Nature*, vol. 443, no. 7112, pp. 663-668.
- Anger, A.M., Armache, J.P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N. & Beckmann, R. 2013, "Structures of the human and Drosophila 80S ribosome", *Nature*, vol. 497, no. 7447, pp. 80-85.
- Atkinson, G.C., Baldauf, S.L. & Hauryliuk, V. 2008, "Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components", *BMC evolutionary biology*, vol. 8, pp. 290-2148-8-290.
- Balagopal, V. & Parker, R. 2011, "Stm1 modulates translation after 80S formation in *Saccharomyces cerevisiae*", *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 17, no. 5, pp. 835-842.
- Balagopal, V. & Parker, R. 2009, "Stm1 modulates mRNA decay and Dhh1 function in *Saccharomyces cerevisiae*", *Genetics*, vol. 181, no. 1, pp. 93-103.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. & Yusupov, M. 2011, "The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 334, no. 6062, pp. 1524-1529.
- Chen, K.Y. & Liu, A.Y. 1997, "Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A", *Biological signals*, vol. 6, no. 3, pp. 105-109.
- Chiabudini, M., Conz, C., Reckmann, F. & Rospert, S. 2012, "Ribosome-associated complex and Ssb are required for translational repression induced by polylysine segments within nascent chains", *Molecular and cellular biology*, vol. 32, no. 23, pp. 4769-4779.
- Coller, J. & Parker, R. 2005, "General translational repression by activators of mRNA decapping", *Cell*, vol. 122, no. 6, pp. 875-886.

Correia, H., Medina, R., Hernandez, A., Bustamante, E., Chakraborty, K. & Herrera, F. 2004, "Similarity between the association factor of ribosomal subunits and the protein Stm1p from *Saccharomyces cerevisiae*" *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 99, no.7, pp. 733-737.

Dinos, G., Dimitrios, L.K., Daniel, N.W. & Knud, H.N. 2005, "Deacylated tRNA is released from the E site upon A site occupation but before GTP is hydrolyzed by EF-Tu" *Nucleic Acids Res*, vol. 33, no. 16, pp. 5291–5296.

Doerfel, L.K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H. & Rodnina, M.V. 2013, "EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 339, no. 6115, pp. 85-88.

Gao, Y.G., Selmer, M., Dunham, C.M., Weixlbaumer, A., Kelley, A.C. & Ramakrishnan, V. 2009, "The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 326, no. 5953, pp. 694-699.

Goldstrohm, A.C., Hook, B.A., Seay, D.J. & Wickens, M. 2006, "PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs", *Nature structural & molecular biology*, vol. 13, no. 6, pp. 533-539.

Gutierrez, E., Shin, B.S., Woolstenhulme, C.J., Kim, J.R., Saini, P., Buskirk, A.R. & Dever, T.E. 2013, "eIF5A promotes translation of polyproline motifs", *Molecular cell*, vol. 51, no. 1, pp. 35-45.

Huang, P., Gautschi, M., Walter, W., Rospert, S. & Craig, E.A. 2005, "The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1", *Nature structural & molecular biology*, vol. 12, no. 6, pp. 497-504.

Inada, T., Winstall, E., Tarun, S.Z., Jr, Yates, J.R.,3rd, Schieltz, D. & Sachs, A.B. 2002, "One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs", *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 8, no. 7, pp. 948-958.

Justice, M.C., Hsu, M.J., Tse, B., Ku, T., Balkovec, J., Schmatz, D. & Nielsen, J. 1998, "Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 6, pp. 3148-3151.

- Kristensen, A.R. & Andersen, J.S. 2008, "Ordered bulk degradation via autophagy", *Autophagy*, vol. 4, no. 8, pp. 1057-1059.
- Kirstein-Miles, J., Scior, A., Deuerling, E. & Morimoto, R.I. 2013, "The nascent polypeptide-associated complex is a key regulator of proteostasis", *The EMBO journal*, vol. 32, no. 10, pp. 1451-1468.
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M. & Peter, M. 2008, "Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease", *Nature cell biology*, vol. 10, no. 5, pp. 602-610.
- Liu, B. & Qian, S. B. 2016, "Characterizing inactive ribosomes in translational profiling Translation" *Austin*, vol. 4, no. 1, e1138018
- Lu, J., Deutsch, C. 2008, "Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates", *Journal of Molecular Biology*, vol. 384, no. 1, pp. 73-86.
- Leshin, J.A., Rakauskaitė, R., Dinman, J.D. & Meskauskas, A. 2010, "Enhanced purity, activity and structural integrity of yeast ribosomes purified using a general chromatographic method", *RNA Biology*, vol. 7, no. 3, pp. 354-360.
- Nygard, O., & Nilsson, L., 1990, "Kinetic determination of the effects of ADP-ribosylation on the interaction of eukaryotic elongation factor 2 with ribosomes", *J Biol Chem*, vol. 265, No.11, pp. 6030-6034.
- Ossareh-Nazari, B., Bonizec, M., Cohen, M., Dokudovskaya, S., Delalande, F., Schaeffer, C., Van Dorselaer, A. & Dargemont, C. 2010, "Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy", *EMBO reports*, vol. 11, no. 7, pp. 548-554.
- Ossareh-Nazari, B., Nino, C.A., Bengtson, M.H., Lee, J.W., Joazeiro, C.A. & Dargemont, C. 2014, "Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy", *The Journal of cell biology*, vol. 204, no. 6, pp. 909-917.
- Park, M.H., Nishimura, K., Zanelli, C.F. & Valentini, S.R. 2010, "Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes", *Amino acids*, vol. 38, no. 2, pp. 491-500.

- Schnier, J., Schwelberger, H.G., Smit-McBride, Z., Kang, H.A. & Hershey, J.W. 1991, "Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Molecular and cellular biology*, vol. 11, no. 6, pp. 3105-3114.
- Shoemaker, C.J. & Green, R. 2011, "Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 51, pp. E1392-8.
- Skogerson, L. & Wakatama, E. 1976, "A ribosome-dependent GTPase from yeast distinct from elongation factor 2", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 1, pp. 73-76.
- Spahn, C.M., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jorgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P. & Frank, J. 2004, "Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation", *The EMBO journal*, vol. 23, no. 5, pp. 1008-1019.
- Takaku, H., Mutoh, E., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. 2001, "Ray38p, a homolog of a purine motif triple-helical DNA-binding protein, Stm1p, is a ribosome-associated protein and dissociated from ribosomes prior to the induction of cycloheximide resistance in *Candida maltosa*", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 284, no. 1, pp. 194-202.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. & Ohsumi, Y. 1992, "Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction", *The Journal of cell biology*, vol. 119, no. 2, pp. 301-311.
- Triana-Alonso, F.J., Chakraborty, K., & Knud, H.N. 1995, "The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor", *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 35, pp. 20473-20478.
- Utsugi, T., Toh-e, A. & Kikuchi, Y. 1995, "A high dose of the STM1 gene suppresses the temperature sensitivity of the tom1 and htr1 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1263, no. 3, pp. 285-288.

Van den Elzen, A.M., Schuller, A., Green, R. & Seraphin, B. 2014, "Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress", *The EMBO journal*, vol. 33, no. 3, pp. 265-276.

Van Dyke, N., Baby, J. & Van Dyke, M.W. 2006, "Stm1p, a ribosome-associated protein, is important for protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under nutritional stress conditions", *Journal of Molecular Biology*, vol. 358, no. 4, pp. 1023-1031.

Van Dyke, N., Pickering, B.F. & Van Dyke, M.W. 2009, "Stm1p alters the ribosome association of eukaryotic elongation factor 3 and affects translation elongation", *Nucleic acids research*, vol. 37, no. 18, pp. 6116-6125.

Willmund, F., del Alamo, M., Pechmann, S., Chen, T., Albanese, V., Dammer, E.B., Peng, J. & Frydman, J. 2013, "The cotranslational function of ribosome-associated Hsp70 in eukaryotic protein homeostasis", *Cell*, vol. 152, no. 1-2, pp. 196-209.

Zhang, Y., Wolfle, T. & Rospert, S. 2013, "Interaction of nascent chains with the ribosomal tunnel proteins Rpl4, Rpl17, and Rpl39 of *Saccharomyces cerevisiae*", *The Journal of biological chemistry*, vol. 288, no. 47, pp. 33697-33707.

Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J.P. & Noller, H.F. 2013, "Crystal structures of EF-G-ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 340, no. 6140, pp. 1236086.

十島 純子, 十島 二郎 (2010) G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のユビキチン化を介したエンドサイトーシス機構、生化学、第82巻、第7号、636-641、日本生化学会

8.謝辞

本研究を行うに当たり、多くの御指導、御鞭撻を賜りました、指導教官の富田野乃准教授に深く感謝申し上げます。未熟な私を常に辛抱強く見守って頂き、さらに研究の発展のために多くのアドバイスを頂きました。研究生活を通じ、沢山のことを学ばせて頂き、成長することができたと自負しております。心から御礼申し上げます。

上田卓也教授には研究会や勉強会において多くの御指導を頂き、さらに素晴らしい研究環境を与えていただきました事に深く感謝いたします。上田研究室の非常に恵まれた環境の下で、研究に従事することができました。

東京大学生命分子遺伝学分野の伊藤耕一教授には、酵母における遺伝学についてご指導頂きました。ここに深く感謝致します。

さらに日々の実験に際しまして多くの助言を頂いた、上田研究室の諸先輩方に厚く御礼申し上げます。また、先輩、後輩を含めた学生の皆様のお陰で、有意義な研究室生活を過ごすことができました。ありがとうございました。

最後に、これまで私の意思を常に尊重し、温かく見守り続けてくれた家族に対して強い感謝の意を表して謝辞と致します。

2017 年

林 光